



**Modulação das Respostas de Activação  
Plaquetária pelo Eptifibatide: Uma Abordagem  
Citómica e Proteómica**

**Cláudia Andrade**

Junho 2011

**Modulação das Respostas de Activação Plaquetária  
pelo Eptifibatide: Uma Abordagem Citómica e  
Proteómica**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Saúde do Vale do Ave para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Técnicas de Biologia Molecular e Citómica nas Ciências da Saúde, realizada sob orientação científica da Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Monteiro, Professora do Instituto Politécnico de Saúde do Norte, CESPUN.

Dedico esta tese aos meus sobrinhos,  
Rita, Gabriela, Inês e Ricardo.

## **Agradecimentos**

Expresso os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização desta tese.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Rita Ferreira e Professora Doutora Maria do Céu Monteiro, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada, pela sabedoria transmitida ao longo deste período e pelo apoio incondicional e compreensão que sempre me proporcionaram.

Ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro, em nome do Professor Doutor Francisco Amado pela colaboração prestada e pelas excelentes condições de trabalho que me proporcionou, sem as quais não seria possível a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Rui Vitorino pelos seus valiosos conhecimentos científicos e pelo inestimável acompanhamento e disponibilidade no trabalho laboratorial.

A todo o grupo de espectrometria de massa da Universidade de Aveiro pela simpatia com que me receberam, em especial ao Renato e ao Miguel pela ajuda constante e crucial no trabalho laboratorial e pelas magníficas explicações que me transmitiram.

À Doutora Maria José pela disponibilidade permanente na realização das colheitas de sangue imprescindíveis para a execução deste trabalho.

A todos aqueles que gentilmente doaram sangue para que este trabalho fosse possível.

À Professora Doutora Begoña Criado pelo acompanhamento e encorajamento constantes em todas as fases que levaram à concretização desta tese.

Ao Pedro pela paciência, pelo apoio incondicional e pelo carinho e compreensão com que sempre me ouviu e me ajudou durante toda esta jornada.

A todas as minhas amigas em especial à Patrícia, à Mariana, à Vanessa, à Ana Isabel e à Joana, pela amizade, pelos momentos de diversão e pela confiança que me fez acreditar que era possível chegar ao fim deste trabalho com sucesso.

Aos meus pais pela compreensão e ternura que sempre me transmitiram em todas as etapas da minha vida. Obrigado por muitas vezes abdicarem dos vossos sonhos para realizarem os meus, sem vocês nunca teria conseguido chegar até aqui.

**Palavras-chave** Plaquetas, GPIIb/IIIa, Eptifibatide, Citómica, Proteómica

**Resumo** Os antiplaquetários são actualmente bastante utilizados no controlo das doenças cardiovasculares, a principal causa de morte no mundo ocidental. De entre estes, o Eptifibatide tem demonstrado reduzir as complicações isquémicas agudas sem risco aumentado de efeitos adversos. Contudo, os mecanismos moleculares subjacentes à acção do Eptifibatide nas respostas de activação plaquetária permanecem por esclarecer. Nesse sentido, no presente estudo, (i) analisaram-se, em amostras de sangue total, diversos parâmetros bioquímicos de activação plaquetária por citometria de fluxo (CMF), em resposta a diferentes agonistas, antes e após a exposição ao Eptifibatide, e (ii) caracterizaram-se as alterações induzidas pelo Eptifibatide no perfil proteico do secretoma das plaquetas, utilizando 2D-PAGE-MS/MS. De um modo geral, os resultados evidenciaram uma diminuição da secreção das plaquetas na presença deste fármaco, associada a uma diminuição da activação de GPIIb/IIIa e da mobilização de  $Ca^{2+}$ . A secreção de proteínas relacionadas com a hemostase, tais como o fibrinogénio e a trombospondina-1, diminuíram significativamente na presença de Eptifibatide, ao contrário dos níveis da enzima antioxidante peroxiredoxina 2 e da variante do factor plaquetário 4. De um modo geral, os nossos resultados demonstram que a utilização de uma abordagem metodológica integrada, na avaliação do efeito do Eptifibatide na funcionalidade das plaquetas, é fundamental para elucidar os mecanismos segundo os quais o fármaco em estudo influencia as respostas de activação plaquetária, imprescindível na correcta avaliação e monitorização terapêutica das doenças cardiovasculares.

**Keywords**

Platelets, GPIIb/IIIa, Eptifibatide, Cytomics, Proteomics

**Abstract**

The antiplatelet agents are currently widely used in the control of cardiovascular diseases, the leading cause of death in the Western world. Among them, Eptifibatide has been shown to reduce acute ischemic complications without any increased risk of adverse effects. However, the molecular mechanisms underlying the action of Eptifibatide in platelet activation responses remain unclear. Accordingly, in this study: (i) various biochemical markers of platelet activation were analyzed in whole blood samples, by flow cytometry (FCM), with different agonists before and after exposure to Eptifibatide, and (ii) platelet releasate proteome changes induced by Eptifibatide were characterized using 2-D-PAGE-MS/MS. In overall, the results showed a decrease of platelets secretion in the presence of this drug, associated with a decrease of GPIIb/IIIa-activation and  $Ca^{2+}$  mobilization. The secretion of proteins related to haemostasis such as fibrinogen and thrombospondin-1 significantly decreased in the presence of Eptifibatide, unlike the levels of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 2 and the variant of platelet factor 4. Overall, our results highlight that the use of an integrated methodological approach, to assess the effect of Eptifibatide on platelet function, is crucial to show the mechanisms how this drug influences the platelet activation responses, crucial to the correct therapeutic assessment and monitorization in cardiovascular diseases.

---

## Índice

<b>I. Introdução</b> .....	2
<b>II. Revisão Literária</b> .....	5
<b>1. Características Gerais das Plaquetas</b> .....	5
1.1. Origem e Formação das Plaquetas .....	5
1.2. Estrutura das Plaquetas .....	6
1.2.1. Membrana Plaquetária .....	6
1.2.2. Citoesqueleto .....	6
1.2.3. Grânulos .....	7
1.2.3.1. Grânulos $\alpha$ .....	7
1.2.3.2. Grânulos densos .....	8
1.2.3.3. Lisossomas .....	8
1.2.4. Sistemas Membranares .....	10
<b>2. O Papel das Plaquetas na Hemostase</b> .....	10
2.1. Activação Plaquetária: Sequência de Eventos Bioquímicos .....	10
2.2. Agonistas Plaquetários .....	12
2.3. Respostas Funcionais .....	14
2.3.1. Adesão e Modificação de Forma .....	14
2.3.2. Agregação Plaquetária .....	15
2.3.3. Micropartículas e Actividade Pró-coagulante .....	15
2.3.4. Secreção Plaquetária .....	16
<b>3. Participação das Plaquetas em Processos Fisiológicos e Patológicos</b> .....	18
<b>4. As Plaquetas como Alvo Terapêutico</b> .....	20
4.1. Agentes Antiplaquetários .....	20
4.1.1. Antagonistas da GPIIb/IIIa .....	20
4.2. A Maquinaria de Secreção como Alvo Terapêutico .....	22
4.3. Variabilidade Inter-individual na Resposta Antiplaquetária .....	22
<b>5. Métodos de Avaliação da Função Plaquetária</b> .....	23

---

5.1. Análise da Agregação Plaquetária .....	24
5.2. Análise de Marcadores de Activação Plaquetária por Citometria de Fluxo .....	25
5.3. Análise do Genoma Plaquetário .....	27
5.4. Análise do Proteoma Plaquetário .....	28
5.4.1. Proteómica Aplicada ao Estudo do Secretoma das Plaquetas .....	30
6. Objectivos .....	32
<b>III. Material e Métodos</b> .....	<b>35</b>
1. Desenho Experimental .....	35
2. Grupo de Estudo .....	36
3. Recolha e Processamento das Amostras .....	36
4. Análise Funcional .....	37
4.1. Análise Multiparamétrica por Citometria de Fluxo .....	37
4.1.1. Pré-tratamentos das Amostras com Eptifibatide .....	37
4.1.2. Determinação de Parâmetros Bioquímicos de Activação Plaquetária .....	37
4.2. Análise da Agregação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) por Agregometria Óptica .....	40
5. Análise do Perfil Proteico .....	41
5.1. Isolamento da Fracção Proteica Libertada pelas Plaquetas .....	41
5.1.1. Monitorização por Citometria de Fluxo .....	42
5.2. Electroforese em Gel .....	42
5.2.1. Preparação das Amostras .....	42
5.2.2. Electroforese SDS-PAGE .....	43
5.2.3. Electroforese Bidimensional (2D- PAGE) .....	43
5.2.4. Revelação dos Géis com <i>Comassie Coloidal Blue</i> (G250) .....	44
5.3. Preparação das Amostras para Análise por Espectrometria de Massa .....	44
5.4. Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF) .....	45
6. Análise Estatística dos Resultados .....	45
<b>IV. Resultados</b> .....	<b>47</b>
1. Interações estabelecidas pela GPIIb/IIIa .....	47

---



---

<b>2. Análise Funcional</b> .....	50
2.1. Análise da Agregação do PRP por Agregometria Óptica.....	50
2.2. Análise Multiparamétrica por Citometria de Fluxo.....	51
2.2.1. Determinação Cinética da Mobilização do Cálcio Intracelular .....	51
2.2.2. Determinação da Polimerização de Actina e Cinética das Alterações Morfológicas das Plaquetas .....	53
2.2.3. Determinação da Expressão de CD62 na Superfície Plaquetária .....	57
2.2.4. Detecção de Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS) .....	58
<b>3. Caracterização do Perfil Proteico do Secretoma das Plaquetas</b> .....	60
3.1 Análise do Perfil Proteico da Fracção Libertada pelas Plaquetas por SDS-PAGE	60
3.2. Análise do Perfil Proteico da Fracção Libertada pelas Plaquetas por 2D- PAGE.	66
3.3. Análise do Efeito do Eptifibatide no Perfil Proteico da Fracção Libertada pelas Plaquetas.....	69
<b>V. Discussão</b> .....	74
<b>VI. Conclusão</b> .....	81
<b>VII. Referências Bibliográficas</b> .....	84
<b>VIII. Anexos</b> .....	XI

**Índice de Figuras**

<b>Figura 2.1.</b> Ativação plaquetária e subsequente metabolismo do fosfatidil inositol.....	11
<b>Figura 2.2.</b> Mecanismos envolvidos na ativação plaquetária através da interação de diferentes agonistas (colagénio, ADP, trombina e TXA <sub>2</sub> ) com receptores expressos na membrana plaquetária. (Adaptado de Shaun <i>et al.</i> , 2004).....	13
<b>Figura 2.3.</b> Modelo hipotético da interação da maquinaria SNARE na secreção plaquetária. ....	17
<b>Figura 3.1.</b> Esquema representativo da sequência de procedimentos técnicos utilizados na análise de parâmetros bioquímicos de ativação plaquetária (abordagem citómica) e na análise das proteínas libertadas pelas plaquetas (abordagem proteómica), em resposta ao Eptifibatide. ....	35
<b>Figura 4.1.</b> Esquema das potenciais interações descritas na literatura que podem ser estabelecidas pela GPIIb (ITA2B) ( <i>Plug-in Apid</i> do <i>Cytoskape</i> ).....	47
<b>Figura 4.2.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na ligação de PAC-1, após a estimulação das plaquetas no sangue total com trombina (0,05 e 0,5 U/mL), ADP (5 µM) e TRAP (15 µM). UAF: PAC1-FITC, unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total (eventos CD61+). Os resultados são expressos em média ± desvio padrão dos cinco dadores. ....	49
<b>Figura 4.3.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na agregação plaquetária induzida pelo ADP (10 µM). Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de cinco dadores obtidos em experiências independentes. Foi obtido um IC <sub>50</sub> de 0,062 µg/mL. ....	50
<b>Figura 4.4.</b> Efeito do Eptifibatide nos rácios das respostas máximas de Ca <sup>2+</sup> livre citosólico, após a estimulação das plaquetas no sangue total com (A) trombina 0,05 U/mL; (B) trombina 0,5 U/mL, (C) ADP 5 µM e (D) TRAP 15 µM. Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5). ....	52
<b>Figura 4.5.</b> Resultados da cinética de cálcio citosólico livre, após a estimulação com trombina a 0,5 U/mL, representativos de um dos cinco dadores (N5). UAF: Fluo-4 – unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária (eventos CD41+). ....	53
<b>Figura 4.6.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na ligação de faloidina após a estimulação das plaquetas com (A) trombina 0,05 U/mL; (B) trombina 0,5 U/mL, (C) ADP 5 µM e (D) TRAP 15 µM. UAF: Faloidina-FITC, unidades arbitrárias de fluorescência na população	

---

plaquetária total. Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5). .....	55
<b>Figura 4.7.</b> Efeito do Eptifibatide nos rácios das respostas máximas de SS, após a estimulação das plaquetas no sangue total com (A) trombina 0,05 U/mL; (B) trombina 0,5 U/mL, (C) ADP 5 $\mu$ M e (D) TRAP 15 $\mu$ M. Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5). .....	56
<b>Figura 4.8.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 $\mu$ g/mL) na expressão de CD62P, após a estimulação das plaquetas no sangue total com (A) trombina 0,05 U/mL; (B) trombina 0,5 U/mL, (C) ADP 5 $\mu$ M e (D) TRAP 15 $\mu$ M. UAF: CD62P-FITC, unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total (eventos CD41+). Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).....	58
<b>Figura 4.9.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 $\mu$ g/mL) na produção de ROS após a estimulação das plaquetas com colagénio (10 $\mu$ g/mL). UAF: DHR123, unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total (eventos CD41+). Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).....	59
<b>Figura 4.10.</b> Análise por SDS-PAGE do secretoma das plaquetas antes e após activação com trombina 0,5 U/mL, e com ou sem pré-tratamento com Eptifibatide (0,1 $\mu$ g/mL). Do lado direito da imagem do gel de SDS-PAGE é apresentada uma análise comparativa do perfil de OD de cada amostra analisada. (OD: densidade óptica (em unidades arbitrárias); PPP: plasma pobre em plaquetas; EF: amostra activada com trombina 0,5 U/mL após tratamento com Eptifibatide; B: amostra basal e TR: amostra activada com trombina 0,5 U/mL). .....	61
<b>Figura 4.11.</b> (A) Análise por SDS-PAGE do secretoma das plaquetas antes e após activação com trombina 0,5 U/mL, normalizada à quantidade de proteína secretada pelas plaquetas (B vs TR) e ao número de plaquetas (B1 vs TR1). (B) Análise comparativa do perfil de OD do gel SDS-PAGE, entre as amostras B1 e TR1. (PPP: plasma pobre em plaquetas; B e B1: amostras basais; TR e TR1: amostras activada com trombina 0,5 U/mL; OD: densidade óptica expressa em unidades arbitrárias).....	62
<b>Figura 4.12.</b> Variação de fluorescência de CD62-FITC e PAC1-FITC em amostras de sangue total, plaquetas lavadas e plaquetas retidas no sedimento, antes e após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, segundo o protocolo descrito por Piersma <i>et al.</i> (2009) (A e B) e de acordo com o protocolo optimizado no presente estudo (C e D).....	63

---

- Figura 4.13.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por SDS-PAGE-MS/MS, tendo por base o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA), relativamente à localização celular. .... 64
- Figura 4.14.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por SDS-PAGE-MS/MS, agrupadas relativamente ao processo biológico tendo por base (A) o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA) e tendo por base o (B) PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*). .. 65
- Figura 4.15.** Análise por 2D-PAGE da fracção de proteínas libertadas pelas plaquetas estimuladas com trombina 0,5 U/mL, antes (A) e após (B) pré-tratamento com Eptifibatide 0,1 µg/mL. As proteínas assinaladas na imagem têm correspondência com a numeração apresentada na Tabela 4.7..... 66
- Figura 4.16.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS, tendo por base o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA), relativamente à localização celular. .... 67
- Figura 4.17.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS agrupadas relativamente ao processo biológico tendo por base (A) o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA) e tendo por base o (B) PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*) .. 68

---

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 2.1.</b> Conteúdo proteico dos grânulos citoplasmáticos das plaquetas (adaptado de Reed <i>et al.</i> , 2007). .....	9
<b>Tabela 4.1.</b> Possíveis interações estabelecidas pela GPIIb (ITA2B), de acordo com o <i>Plug-in Apid</i> do <i>Cystoskape</i> . .....	48
<b>Tabela 4.2.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) nos rácios das respostas máximas de Ca <sup>2+</sup> livre citosólico após estimulação das plaquetas do sangue total com os diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5 µM e TRAP 15 µM.....	51
<b>Tabela 4.3.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na ligação de Faloidina induzida por diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5µM e TRAP 15 µM.....	54
<b>Tabela 4.4.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) nos rácios das respostas máximas das alterações morfológicas após estimulação das plaquetas do sangue total com os diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5 µM e TRAP 15 µM.....	56
<b>Tabela 4.5.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na expressão de CD62P induzida por diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5µM e TRAP 15 µM.....	57
<b>Tabela 4.6.</b> Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) nas alterações de fluorescência de DHR123 induzidas pelo colagénio (10 µg/mL).....	59
<b>Tabela 4.7.</b> Proteínas diferencialmente libertadas pelas plaquetas após o tratamento com Eptifibatide e/ou estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS (para um <i>protein score CI%</i> superior a 95%). .....	70
<b>Tabela 8.1.</b> Proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por SDS-PAGE-MS/MS (para um <i>protein score CI%</i> superior a 95%).XI	
<b>Tabela 8.2.</b> Proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS (para um <i>protein score CI%</i> superior a 95%). XIII	

---

**Lista de Abreviaturas**

<b>ABP</b>	Proteína de ligação actina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CMF</b>	Citometria de fluxo
<b>COFRADIC</b>	<i>Combined fractional diagonal chromatography</i>
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>DAG</b>	Diacil Glicerol
<b>DHR123</b>	Dihidrorodamina123
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>2D-PAGE</b>	Electroforese bidimensional
<b>EGF</b>	Factor de crescimento epidérmico
<b>FS</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GOA</b>	<i>Gene Ontology Annotation</i>
<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>GPRP</b>	Tetrapéptido sintético glicina-prolina-arginina-prolina
<b>GPS</b>	<i>Global Protein Server</i>
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina
<b>IMPACT-II</b>	<i>Integrilin to Minimize Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis-II</i>
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>PAF</b>	Factor ativador das plaquetas
<b>PANTHER</b>	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
<b>PAR</b>	Receptor protease activado

<b>PBP</b>	Proteína básica das plaquetas
<b>PDGF</b>	Factor de crescimento derivado da plaqueta
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PF4</b>	Factor plaquetário 4
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>pI</b>	Ponto isoeléctrico
<b>PIP2</b>	Fosfatidil inositol 4,5-difosfato
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PPP</b>	Plasma pobre em plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>PSP</b>	Proteína plaquetária Sec1
<b>PTMs</b>	Modificações pós-traducionais
<b>LC</b>	Cromatografia líquida
<b>MALDI</b>	Ionização por desorção por laser assistida pela matriz
<b>min.</b>	Minutos
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massa <i>tandem</i>
<b>MudPIT</b>	Tecnologia de identificação proteica multidimensional
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>RPFA</b>	<i>Rapid platelet function assay</i>
<b>SAGE</b>	<i>Serial analysis of gene expression</i>
<b>SCA</b>	Sistema canalicular aberto
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforese em gel de poliacrilamina com dodecil sulfato de sódio
<b><math>\alpha</math>-SPD</b>	Síndrome de <i>Gray</i>
<b>STD</b>	Sistema tubular denso
<b>SS</b>	<i>Side scatter</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b><math>\beta</math>-TG</b>	$\beta$ -tromboglobulina
<b>TIH</b>	Trombocitopenia induzida por heparina

<b>TOF</b>	Tempo-de-vo0
<b>TRAP</b>	Péptido activador do receptor da trombina
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>UAF</b>	Unidades arbitrárias de fluorescência
<b>vWF</b>	Factor de von Willebrand



---

## I – Introdução

---

## I. INTRODUÇÃO

As plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostase primária. Após a lesão vascular, em resposta a agonistas fisiológicos, as plaquetas são activadas e libertam uma variedade de componentes existentes nos grânulos citoplasmáticos. Esta fracção que é libertada apresenta um alto conteúdo proteico e é responsável pela activação de outras plaquetas, cicatrização e resposta inflamatória, estando ainda implicada na angiogénese, crescimento e adesão celular (Wagner *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2004). Do ponto de vista patológico, a activação plaquetária indesejada está associada à formação de trombos arteriais, que estão na origem de doenças cardiovasculares de natureza trombótica, reconhecidas actualmente como as principais causas de morte dos países ocidentais (Jurk *et al.*, 2007; Harrison *et al.*, 2005).

Assim, os agentes antiplaquetários são frequentemente utilizados na profilaxia primária e secundária de doentes com tendência, ou em estado pró-trombótico. O receptor do fibrinogénio activado (GPIIb/IIIa), exerce um papel fundamental na agregação plaquetária, tendo-se verificado no modelo animal que o bloqueio deste receptor previne eficazmente episódios de trombose arterial (Michelson *et al.*, 2001). Entre os inibidores mais específicos desta classe de fármacos encontra-se o Eptifibatide, amplamente utilizado em situações de isquemia coronária, que incluem, intervenção coronária percutânea, enfarte agudo do miocárdio e angina instável, onde demonstrou reduzir as complicações isquémicas agudas, com baixo risco de efeitos adversos (Michelson *et al.*, 2001). Contudo, denota-se uma grande variabilidade interindividual em resposta a estes fármacos, visto que, se para alguns doentes são fármacos seguros e efectivos, para outros podem ser ineficazes e/ou prejudiciais.

O facto de as plaquetas serem desprovidas de núcleo e por isso de informação genética relevante, faz com que proteómica seja uma abordagem promissora comparativamente à genómica, como ferramenta fundamental na compreensão da bioquímica das plaquetas. Nos últimos anos assistiu-se a uma progressão significativa na elucidação do proteoma das plaquetas humanas num estado basal ou activado, bem como na aplicação da proteómica no estudo das vias de sinalização responsáveis pela activação plaquetária, o que permitiu a identificação de novas proteínas de sinalização e de membrana (Coppinger *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004). Paralelamente, tem-se verificado um interesse particular no sub-proteoma das

plaquetas, nomeadamente na fracção proteica libertada pelos grânulos especializados, uma vez que a libertação desses factores durante a adesão a vasos danificados e subsequente activação plaquetária é selectiva (García *et al.*, 2005).

Neste sentido, a caracterização do secretoma das plaquetas com métodos analíticos que permitam determinar objectivamente o estado funcional da população plaquetária, poderá contribuir para a descoberta de novos biomarcadores e alvos terapêuticos que permitam um melhor diagnóstico e tratamento das doenças cardiovasculares (Sander *et al.*, 2009; Judith *et al.*, 2007).

---

## II – Revisão Literária

---

## II. REVISÃO LITERÁRIA

### 1. Características Gerais das Plaquetas

As plaquetas são pequenas células anucleadas, provenientes da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos medulares, que circulam na corrente sanguínea desempenhando um papel fundamental na hemostase primária. Por outro lado, contribuem para a reparação e manutenção da integridade do endotélio vascular, devido à capacidade de libertarem múltiplos factores que estimulam o crescimento e a função dos fibroblastos e das células endoteliais, como o PDGF, EGF e o TGF- $\beta$  (Bessis, 1973; Simon *et al.*, 2008).

Em condições fisiológicas normais, as plaquetas não activadas possuem uma forma de disco biconvexo, com um diâmetro compreendido entre 2,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  e 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura (Tocantins, 1938; White, 1971). Estas dimensões reduzidas permitem às plaquetas localizarem-se convenientemente assegurando a constante preservação da integridade dos vasos sanguíneos. No sangue periférico de indivíduos saudáveis, a concentração de plaquetas oscila entre as 150.000 e 450.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ , onde permanecem em média 7 a 10 dias, com uma taxa de renovação diária de 35.000 plaquetas/ $\mu\text{L}/\text{dia}$  (Bessis, 1973).

#### 1.1. Origem e Formação das Plaquetas

Originárias do citoplasma dos megacariócitos, células extremamente grandes com um núcleo altamente polipóide, as plaquetas são desprovidas de DNA genómico (nuclear), pelo que contêm apenas RNA mensageiro (mRNA) derivado dos megacariócitos e a maquinaria necessária à síntese proteica. Adicionalmente, têm a capacidade de captar proteínas plasmáticas circulantes e armazená-las no interior dos grânulos citoplasmáticos (Golde, 1991; Ogawa, 1993).

Os mecanismos pelos quais as plaquetas são produzidas e libertadas dos megacariócitos ainda não se encontram completamente esclarecidos. Alguns investigadores defendem que a libertação das plaquetas ocorre após delimitação de territórios citoplasmáticos e fragmentação da membrana plasmática (Yamada *et al.*, 1957). Contudo, a teoria aceite pela maioria dos investigadores assenta na formação de pró-plaquetas, projecções citoplasmáticas (pseudópodes) emitidas pelos megacariócitos,

que após ruptura em áreas de constrição, libertam as plaquetas directamente na corrente sanguínea (Long & Hoffman, 1995; Burstein & Breton-Gorius, 1995).

## **1.2. Estrutura das Plaquetas**

Apesar da sua aparência simples ao microscópio, as plaquetas apresentam uma estrutura complexa que possibilita o desempenho de uma grande variedade de funções, associadas a numerosos organelos subcelulares: membrana plaquetária; citoesqueleto; grânulos, sistemas membranares e outros componentes celulares (White, 1976).

### **1.2.1. Membrana Plaquetária**

A membrana plaquetária, responsável pelas interacções produzidas entre as plaquetas e o exterior, é formada fundamentalmente por três camadas. Uma camada externa, denominada glicocálice, é constituída por glicoproteínas (GP) de membrana, que actuam como receptores, mediando três das funções chave à manutenção da hemostase: a adesão das plaquetas à superfície vascular danificada, a agregação plaquetária e a interacção das plaquetas com outras células. Inicialmente denominadas segundo a ordem pela qual apareciam em géis de electroforese (I, II, III, IV, V ou VI), foram subclassificadas de acordo com as semelhanças genéticas e estruturais em diferentes famílias: integrinas, GP ricas em leucina e selectinas. A segunda camada da membrana plaquetária apresenta a estrutura típica da bicamada fosfolipídica, assimétrica, especialmente rica em ácido araquidónico. Em resposta à activação, a membrana expõe uma superfície carregada negativamente (rica em fosfatidilserina), essencial para a activação de factores da coagulação (actividade pró-coagulante). O ácido araquidónico, libertado pelos fosfolípidos, é precursor no metabolismo dos eicosanóides, participando na transmissão do estímulo recebido na membrana até às regiões celulares efectoras. A camada mais interna constitui a área submembranar que se encontra unida às porções transmembranares de algumas GP e contém filamentos submembranares que fazem parte do citoesqueleto. É nesta área que ocorre a transdução dos sinais recebidos na superfície exterior em mensagens químicas e alterações físicas que activam as plaquetas (Kieffer, 1990; Bennett, 1991; Peerschke, 1992).

### **1.2.2. Citoesqueleto**

O citoesqueleto das plaquetas é constituído por uma rede de estruturas filamentosas, envolvidas na maioria das respostas plaquetárias: alteração de forma,

secreção, formação do rolhão hemostático e retracção do coágulo. Esta rede é composta essencialmente por proteínas contrácteis, como a actina e a miosina, envolvidas na alteração de forma das plaquetas após a sua activação (descrito no ponto 2.3.1), e por proteínas envolvidas na formação de microtúbulos, como a tubulina, responsável pela manutenção da forma discóide das plaquetas não activadas e pela organização e direccionamento dos movimentos gerados pela interacção actina-miosina. Para além destas proteínas, o citoesqueleto é ainda constituído por muitas outras envolvidas na organização dos filamentos, tais como a  $\alpha$ -actinina, a proteína de ligação à actina (ABP), a gelsolina, a profilina, a talina, a tropomiosina, vinculina, entre outras (Escolar *et al.*, 1986; Lefebvre *et al.*, 1993).

### 1.2.3. Grânulos

As plaquetas contêm três tipos de grânulos citoplasmáticos: grânulos  $\alpha$ , grânulos densos e lisossomas, cujos conteúdos são libertados no espaço extracelular por exocitose em consequência da estimulação plaquetária (Tabela 2.1). Contudo, a secreção dos diferentes tipos de grânulos é sequencial e depende da intensidade da activação plaquetária. A libertação dos grânulos  $\alpha$  requer uma estimulação menor das plaquetas do que a libertação dos grânulos densos, que por sua vez é menor à necessária para libertar os lisossomas (descrito no ponto 2.3.4) (Flaumenhaft *et al.*, 2003).

#### 1.2.3.1. GRÂNULOS $\alpha$

A secreção dos grânulos  $\alpha$  resulta na libertação de um elevado número de substâncias que podem dividir-se em: factores mitogénicos, proteínas plaquetárias específicas, factores de coagulação, factores de permeabilidade vascular, inibidores proteolíticos e factores fibrinolíticos. Assim, as plaquetas contêm proteínas específicas, que incluem o factor plaquetário 4 (PF4) e a sua variante, com grande afinidade de ligação ao endotélio e actividade quimiotáctica, a  $\beta$ -tromboglobulina ( $\beta$ -TG), que apresenta elevada homologia estrutural com o PF4, e o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), envolvido na reparação da parede do vaso lesado. Estão também presentes outras proteínas sintetizadas pelos megacariócitos tais como: (i) a proteína básica das plaquetas (PBP), que possui uma elevada actividade mitogénica e (ii) factores proteicos que participam na coagulação sanguínea e nos processos adesivos plaqueta-plaqueta ou plaqueta-subendotélio; incluindo o fibrinogénio, o factor de von Willebrand

(vWF), a trombospondina, os factores V, VIII e XI e o plasminogénio. A membrana dos grânulos  $\alpha$  contém ainda proteínas que se expressam ou aumentam a sua expressão à superfície da célula após activação plaquetária como a P-selectina, a GPIIb/IIIa e a osteonectina (Reed, 2000; Qiansheng *et al.*, 2008)

A confirmação de que as plaquetas têm um papel fundamental na patogénese da aterosclerose só foi possível através do estudo dos grânulos específicos, uma vez que as plaquetas libertam factores de crescimento envolvidos na proliferação do músculo liso, para além de libertarem colagenases que podem modificar a parede vascular (Flaumenhaft *et al.*, 2003; Bronhard-Bohn *et al.*, 2001).

### **1.2.3.2. GRÂNULOS DENSOS**

Os grânulos densos são facilmente diferenciados dos grânulos  $\alpha$  por microscopia electrónica, devido à elevada concentração de cálcio, fósforo e magnésio, que lhes confere maior densidade. Para além destes iões, libertados para a corrente sanguínea após activação plaquetária, os grânulos densos possuem ainda nucleótidos de adenina (ADP, ATP) e 5-hidroxitriptamina (5-HT) (McNicol *et al.*, 1999; Crosby & Poole, 2004).

A libertação dos nucleótidos de adenina tem importância fisiopatológica, particularmente o ADP, que induz a estimulação de outras plaquetas, favorecendo o recrutamento plaquetário. Contrariamente, o ATP antagoniza a acção pró-agregante do ADP. Uma vez secretados, a serotonina e o ADP exercem efeitos vasoactivos, induzindo a contracção das artérias danificadas. Adicionalmente, a 5-HT tem um efeito pró-agregante fraco sobre as plaquetas e potencia o efeito de outros indutores da resposta plaquetária (King *et al.*, 2009).

### **1.2.3.3. LISOSSOMAS**

A estimulação das plaquetas com elevadas doses de trombina origina a libertação dos lisossomas plaquetários, grânulos com actividade proteolítica e hidrolítica, devido na sua maioria à existência de hidrolases ácidas. Ao contrário dos grânulos referidos anteriormente, a libertação do conteúdo dos lisossomas pela acção de agonistas fortes é apenas parcial (Metzelaar *et al.*, 1992).



Na Tabela 2.1 encontram-se discriminadas as principais proteínas existentes nos grânulos citoplasmáticos das plaquetas.

**Tabela 2.1.** Conteúdo proteico dos grânulos citoplasmáticos das plaquetas (adaptado de Reed *et al.*, 2007).

Conteúdo dos Grânulos Citoplasmáticos das Plaquetas	
<b>Grânulos <math>\alpha</math></b>	
Moléculas de adesão	P-selectina <sup>a</sup> , vWF <sup>a</sup> , trombospondina <sup>a</sup> , fibrinogénio, integrina $\alpha$ IIb $\beta$ 3, integrina $\alpha$ v $\beta$ 3, fibronectina
Citocinas	PBP <sup>b,c</sup> , PF4 <sup>b</sup> e variante, $\beta$ -TG <sup>b</sup> , MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-3, CXCL1 ( <i>growth-regulated oncogene-<math>\alpha</math></i> ), ENA-78, IL-8
Moléculas envolvidas na coagulação	Factor V <sup>a</sup> , <i>multimerin</i> <sup>a</sup> , factor VIII
Moléculas que intervêm na fibrinólise	$\alpha$ 2-macroglobulina, plasminogénio, activador/inibidor 1 do plasminogénio
Moléculas com acção no crescimento e angiogénese	Factor de crescimento fibroblástico, EGF, factor de crescimento hepatócito, factor de crescimento semelhante à insulina, factor de transformação $\beta$ , factor A e C de crescimento endotelial vascular, PDGF <sup>b</sup>
Moléculas imunológicas	$\beta$ 1H, globulina, factor D, c1 inibidor, IgG
Outras proteínas	Albumina, $\alpha$ 1-antitripsina, Gas6, GP rica em histidina, <i>kininogen</i> , osteonectina, protease nexina-II (percursor da proteína $\beta$ -amilóide)
<b>Grânulos densos</b>	
Iões	Cálcio, magnésio, fósforo pirofosfato
Nucleótidos	ATP, GTP, ADP, GDP
Proteínas de membrana	CD63, LAMP2
Mensageiros secundários	Serotonina
<b>Lisossomas</b>	
Enzimas hidrolíticas	Hidrolases ácidas
Proteínas de membrana	CD63, LAMP1, LAMP2

<sup>a</sup> proteínas sintetizadas ou captadas pelos megacariócitos e que se encontram em algumas células.

<sup>b</sup> proteínas específicas das plaquetas.

<sup>c</sup> PBP sofre proteólise originando PF4 e  $\beta$ -TG.

**Nota:** Muitas outras proteínas foram identificadas no secretoma das plaquetas mas a sua presença nos grânulos ainda não foi demonstrada.

Para além dos grânulos directamente implicados na função hemostática, sabe-se que as plaquetas possuem organelos essenciais ao metabolismo energético, biossíntese e mecanismos de endocitose e exocitose, que incluem as mitocôndrias, grânulos de glicogénio e inclusões lipídicas (Aaron, 1977). Devido aos elevados requisitos energéticos, nomeadamente para os processos de agregação, secreção e retracção do coágulo, as plaquetas possuem a via glicolítica muito activa, assim como a biossíntese e

degradação do glicogénio. Em repouso, a produção de ATP por fosforilação oxidativa ocorre ao nível da membrana mitocondrial. A mitocôndria, para além das enzimas envolvidas no Ciclo de Krebs, também possui as enzimas envolvidas no processo de  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos (Flaumenhaft *et al.*, 2003; Bronhard-Bohn *et al.*, 2001).

#### 1.2.4. Sistemas Membranares

Os sistemas membranares existentes nas plaquetas incluem o sistema canalicular aberto (SCA) e o sistema tubular denso (STD). O SCA é constituído por uma rede de canais que conecta com a membrana celular, permitindo o acesso de substâncias plasmáticas ao interior da célula, bem como a libertação do conteúdo dos grânulos até ao exterior. Para além disso, constitui uma reserva membranar que permite a alteração de forma e emissão de pseudópodes após activação plaquetária. Por outro lado, o STD é constituído por uma rede contínua, associada aos microtúbulos e ao SCA, responsável pelo armazenamento do cálcio intraplaquetário, necessário à maioria dos fenómenos fisiológicos da plaqueta. As membranas do STD são ainda particularmente ricas em fosfolípidos, que funcionam como substratos necessários à síntese de endoperóxidos de prostaglandinas e tromboxano  $A_2$  (White, 1976; Moriau *et al.*, 1990).

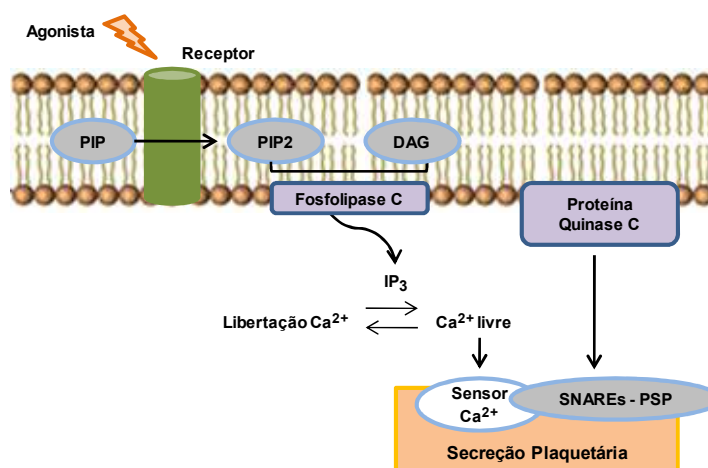
## 2. O Papel das Plaquetas na Hemostase

### 2.1. Activação Plaquetária: Sequência de Eventos Bioquímicos

Em condições fisiológicas normais, as plaquetas não aderem à superfície do endotélio, devido ao equilíbrio existente entre os mecanismos pró- e anti-trombóticos. Contudo, após a lesão do vaso as plaquetas aderem às estruturas subendoteliais expostas, são activadas, mudam de forma, agregam-se entre si e libertam múltiplos factores envolvidos na reparação do vaso lesado. As diversas respostas fisiológicas devem-se à existência de diferentes receptores de membrana responsáveis pelo reconhecimento de sinais extracelulares (Davi *et al.*, 2007; Anjali *et al.*, 2008).

As vias de sinalização activadas por sinais extracelulares envolvem a adenilato ciclase, responsável pela síntese de AMPc, a fosfolipase C, que degrada o fosfatidilinositol para originar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), e a fosfolipase  $A_2$  que liberta o ácido araquidónico dos fosfolípidos e inicia a síntese de tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) (Reed *et al.*, 2000).

De uma forma geral, a activação da fosfolipase C leva à hidrólise do fosfatidilinositol com formação de IP<sub>3</sub> e DAG. O IP<sub>3</sub> actua sobre a libertação de cálcio citoplasmático, imprescindível para a subsequente activação plaquetária. Por outro lado, o DAG activa a proteína cinase C que fosforila resíduos de serina e treonina de várias proteínas plasmáticas, sendo o mensageiro secundário de vários agonistas plaquetários. O aumento da concentração de cálcio citoplasmático tem um papel central na activação plaquetária, promovendo a alteração da forma, a agregação e a secreção das plaquetas (Lawrence *et al.*, 2007) (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Activação plaquetária e subsequente metabolismo do fosfatidil inositol.

(Adaptado de Reed, 2000)

A activação plaquetária induz a libertação de ácido araquidónico por acção da fosfolipase A<sub>2</sub>. O metabolismo do ácido araquidónico resulta na formação de quatro tipos de eicosanóides: prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos e lipoxinas, através de duas vias principais: a via da cicloxigenase e a via da lipoxigenase. Pela acção da cicloxigenase formam-se endoperóxidos muito instáveis, PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, que são metabolizados a diferentes prostaglandinas, responsáveis pela amplificação da activação plaquetária. Nas plaquetas a PGH<sub>2</sub> transforma-se fundamentalmente em TXA<sub>2</sub>, por acção da tromboxano sintetase. Por outro lado, as células endoteliais do músculo liso podem captar os endoperóxidos libertados pelas plaquetas e sintetizar PGI<sub>2</sub>, substância antiagregante e inibidora da reacção de libertação (Daniel *et al.*, 1999). O equilíbrio entre os níveis de PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> é responsável pela manutenção do estado anti-trombótico, onde qualquer desequilíbrio poderá predispor a vasculatura a uma situação pró-agregante e vasoconstritora, que conduzirá ao aparecimento de fenómenos de oclusão. As plaquetas possuem ainda a capacidade de converter o ácido araquidónico e os leucotrienos

derivados de neutrófilos em TXA<sub>2</sub> ou lipoxinas pró-inflamatórias (Lawrence, 2003; Brass *et al.*, 2007).

Outra das vias de transdução de sinal descrita nas plaquetas, envolve receptores tirosina cinase e proteína Ras. A activação plaquetária promove a fosforilação de resíduos de tirosina e activação de Ras com consequente activação de MAP cinases, que fosforilam proteínas associadas aos microtúbulos, P65PAK que fosforila Hsp27 associada ao citoesqueleto, PI-5K, que regula a polimerização de actina e a WASP implicada na reorganização do citoesqueleto, cuja função é evidenciada na Síndrome de Wiskott-Aldrich, na qual as plaquetas apresentam morfologia e organização do citoesqueleto anormais (Eduardo *et al.*, 1986; David *et al.*, 1997).

Pelo contrário, a activação plaquetária é inibida pelo aumento dos níveis do mensageiro secundário AMPc, o qual facilita a entrada de cálcio no STD, reduzindo a sua disponibilidade na plaqueta e inibindo a actividade da fosfolipase A2 (Brass *et al.*, 1997). Em geral, os agonistas plaquetários bloqueiam a adenilato ciclase, inibindo a formação de AMPc e aceleram o metabolismo do AMPc por activação da fosfodiesterase (Sakon *et al.*, 1994).

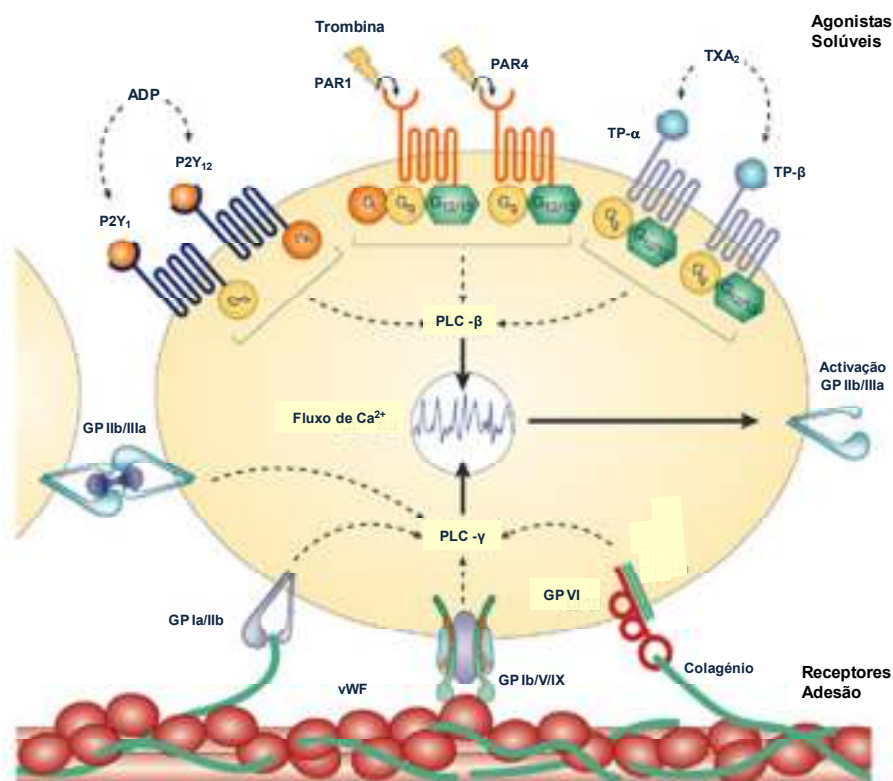
## 2.2. Agonistas Plaquetários

Diversos agonistas fisiológicos podem activar as plaquetas, através da interacção com receptores específicos, existentes na membrana plaquetária. Entre estes, incluem-se o colagénio, ADP, TXA<sub>2</sub>, trombina, factor activador das plaquetas (PAF) e adrenalina. Os agonistas solúveis, ADP, trombina e TXA<sub>2</sub>, actuam normalmente através de receptores acoplados a proteínas G, nomeadamente a membros da família G<sub>q</sub> e G<sub>12</sub>, enquanto os receptores da adrenalina estão acoplados apenas ao membro G<sub>z</sub> da família G<sub>i</sub> (Evelyn & Thomas, 1981).

Na fase inicial de adesão plaquetária estão envolvidos quatro receptores de membrana para o colagénio, dois de ligação directa ao colagénio ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1 ou GPIa/IIa e GPVI) e dois de ligação intermediária via vWF ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3 e GPIb). Em resposta à activação destes receptores é libertado ADP dos grânulos densos. O ADP liga-se a dois receptores, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub>, que quando activados em simultâneo, estimulam a activação plaquetária. À semelhança do ADP, a libertação de TXA<sub>2</sub>, cujos receptores estão associados com G<sub>q</sub> e G<sub>13 $\alpha$</sub> , activa membros da família G<sub>12</sub>, amplificando o estímulo inicial de activação plaquetária (Daniel *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1998).

É ainda de salientar que a trombina é um activador plaquetário mais potente uma vez que é capaz de activar as plaquetas a concentrações tão baixas como 0,1 nM. Embora outros agonistas plaquetários possam causar a hidrólise do fosfatidilinositol, nenhum parece ser tão eficiente como a trombina. A resposta das plaquetas à trombina é mediada por membros da família do receptor activado por protease (PAR), sendo PAR1 e PAR4 expressos nas plaquetas humanas. Quando comparada com a trombina, a adrenalina é considerada um activador fraco das plaquetas, mas capaz de potenciar o efeito de outros agonistas pelo que constitui um forte estímulo à agregação plaquetária. As respostas plaquetárias à adrenalina são mediadas por receptores  $\alpha_{2A}$  – adrenérgicos. Por outro lado, o PAF actua sobre receptores acoplados a PLC, pelo que induz o metabolismo do fosfatidilinositol e a mobilização de cálcio (Leung *et al.*, 1997; Hilberg *et al.*, 2003; Panzer *et al.*, 2006).

Na Figura 2.2 encontram-se esquematizadas as interacções entre os principais agonistas fisiológicos e os receptores expressos na membrana plaquetária.



**Figura 2.2.** Mecanismos envolvidos na activação plaquetária através da interacção de diferentes agonistas (colagénio, ADP, trombina e TXA<sub>2</sub>) com receptores expressos na membrana plaquetária. (Adaptado de Shaun *et al.*, 2004)

Uma vez que a trombina actua promovendo a clivagem da porção terminal do seu receptor, actualmente são utilizados péptidos sintéticos, nomeadamente o péptido

activador do receptor da trombina (TRAP), que partilha muitos dos efeitos da trombina na estimulação plaquetária. Estudos demonstram que o TRAP induz a agregação, a libertação de ATP e de ácido araquidónico, estimula acção da fosfolipase C e a mobilização de cálcio citosólico, entre outros (McNicol & Robson, 1997). No entanto, existe alguma controvérsia acerca das diferenças entre o TRAP e a trombina na activação plaquetária. Assim, à trombina é atribuída uma maior activação devido à clivagem proteolítica e ligação permanente que estabelece com o seu receptor, embora se pense que a activação produzida pelo TRAP, que sem clivar o receptor, mimetiza a sequência de aminoácidos responsáveis pela activação do mesmo, tenha uma duração semelhante à da trombina (Kanthou *et al.*, 1995; Landesberg *et al.*, 2005).

### **2.3. Respostas Funcionais**

Quando expostas aos diferentes agonistas, as plaquetas apresentam diferentes respostas, intimamente associadas *in vivo*, mas que *in vitro*, podem ser estudadas separadamente: i) adesão e alteração de forma, ii) agregação, iii) secreção e iv) expressão de actividade pró-coagulante (Michelson *et al.*, 2004; Anjali *et al.*, 2008).

#### **2.3.1. Adesão e Modificação de Forma**

O processo de adesão plaquetária é mediado por receptores específicos de membrana e vários componentes subendoteliais, como o vWF, colagénio, trombospondina, fibronectina, laminina, entre outros, expostos após a lesão vascular. No início da adesão plaquetária, o complexo GPIb/IX/V tem um papel preponderante ao unir-se ao vWF, sintetizado pelo próprio endotélio. A GPVI e o complexo GPIa/IIa também participam neste processo de adesão por interagirem com o colagénio. Paralelamente, é exposta uma quantidade adicional de GPIIb/IIIa na superfície plaquetária que contribui para o processo de adesão interagindo com várias proteínas de adesão e com o colagénio (Polanowska *et al.*, 1993; Rugerri *et al.*, 2003; Gibbins, 2004).

Após a adesão plaquetária ocorrem diversas modificações de forma, resultantes da reorganização do citoesqueleto. As plaquetas passam de uma forma discóide a esferóide com expansão e emissão de pseudópodes. Durante a activação plaquetária, a libertação da profilina, proteína que estabiliza a actina glomerular, facilita a polimerização a actina filamentosa. A posterior união com proteínas como a ABP, tropomiosina e  $\alpha$ -actinina, determina se os filamentos formados se deslocam para a periferia ou se formam

parte do citoesqueleto nos pseudópodes. Adicionalmente, a polimerização dos microtúbulos favorece a organização e direccionamento dos movimentos gerados pela interacção actina-miosina (Furman *et al.*, 1993).

### 2.3.2. Agregação Plaquetária

A etapa subsequente à adesão das plaquetas ao endotélio e modificação de forma é a união plaqueta-plaqueta mediada pelo receptor do fibrinogénio activado, GPIIb/IIIa, que ao ligar-se ao fibrinogénio, na presença de cálcio, faz a ponte entre as plaquetas. Este processo é inicialmente reversível, tornando-se irreversível pela estabilização das pontes de fibrinogénio, por alterações induzidas no receptor e pela ligação de outras proteínas adesivas, libertadas pelos grânulos  $\alpha$ , ao fibrinogénio (Born *et al.*, 1962; Leung *et al.*, 1986). Durante a agregação plaquetária ocorrem ainda mecanismos responsáveis pela amplificação da activação, que incluem a libertação de ADP e a síntese de eicosanóides, nomeadamente  $TXA_2$ ,  $PGG_2$  e  $PGH_2$  que, ao unirem-se a receptores de membrana, estimulam a hidrólise de fosfatidilinositol, a mobilização de cálcio e a exposição adicional de receptores do fibrinogénio. Perante estímulos fortes, tais como a trombina ou o colagénio, pode ainda ser sintetizado e libertado PAF, responsável pela activação do fosfatidilinositol e exposição dos locais de união ao fibrinogénio (Leung & Nachman, 1986; Jennings & White, 2007).

Assim, a agregação plaquetária é determinante na transmissão de sinais intracelulares, via GPIIb/IIIa, responsáveis pela expansão e manutenção dos agregados, secreção dos grânulos, retracção do coágulo e provavelmente pela expressão de actividade pró-coagulante (Sanguhl *et al.*, 2010).

### 2.3.3. Micropartículas e Actividade Pró-coagulante

O principal responsável pela actividade pró-coagulante expressa pelas plaquetas, que permite a activação de factores da coagulação sanguínea, é a fosfatidilserina. Este fosfolípido encontra-se no folheto interno da bicamada lipídica da membrana das plaquetas e, após a activação plaquetária, desloca-se para o folheto externo. A carga negativa da fosfatidilserina favorece a interacção desta com o cálcio, promovendo a interacção das plaquetas com proteínas da coagulação, responsáveis pela conversão de protrombina em trombina (Bever *et al.*, 1983; Léon *et al.*, 2003).

Com o subsequente aumento dos níveis de cálcio, a actividade das enzimas que regulam a assimetria fosfolipídica da membrana celular é alterada, o que leva ao colapso

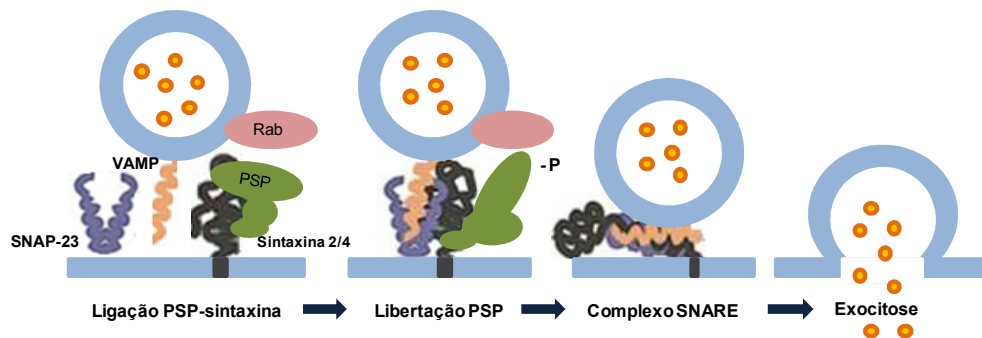
da assimetria lipídica e consequente ruptura das interacções entre os microfilamentos de actina e as glicoproteínas membranares. A ancoragem da membrana à célula é então destruída, permitindo a libertação de micropartículas para o espaço extracelular. As micropartículas, formadas ao longo do tempo de semi-vida da plaqueta ou provenientes directamente dos megacariócitos, têm sido associadas a múltiplas condições clínicas e implicadas no aumento da incidência de complicações tromboembólicas, esclerose múltipla, hipertensão arterial, pré-eclampsia e diabetes. Uma vez que promovem a coagulação, estas micropartículas estão envolvidas na activação e proliferação celular e participam na inflamação e angiogénese, tornando-se assim um alvo terapêutico de eleição (Merten *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 2006; Helley *et al.*, 2009).

#### 2.3.4. Secreção Plaquetária

Após activação, as plaquetas libertam metabolitos e muitas outras substâncias existentes nos grânulos, que entre as inúmeras funções desempenhadas, interagem não só com outras plaquetas mas também com leucócitos e eritrócitos, favorecendo o crescimento do trombo (Rendu *et al.*, 2001; Quiansheng *et al.*, 2008).

A exocitose plaquetária ocorre através de mecanismos homólogos aos utilizados por outras células secretoras especializadas, tais como os neurónios. Nas plaquetas, a exocitose envolve a reorganização dos filamentos de actina, posicionamento e fusão dos grânulos com a membrana plaquetária e libertação do conteúdo intracelular. Este mecanismo envolve proteínas SNARE e moléculas estruturalmente relacionadas derivadas de três famílias que incluem as sintaxinas, VAMP e SNAP-25. As SNARE formam complexos oligoméricos com as membranas, que em modelos membranares demonstraram ser suficientemente fortes para catalisar a fusão membranar (Weber *et al.*, 1998). A interacção das SNAREs é fundamentalmente regulada por proteínas como a PSP (proteína plaquetária Sec1)/Munc18. Por análise da permeabilidade membranar selectiva foi possível estabelecer que a secreção dos grânulos densos ocorre através de um mecanismo dependente de sintaxina 2 que requer a SNAP-23 e a VAMP-3, enquanto a secreção de grânulos  $\alpha$  requer sintaxina 2 e 4, VAMP-3, VAMP-8 e SNAP-23. Quando as plaquetas são activadas, verifica-se a dissociação do complexo PSP/Munc18 – sintaxina 4, que promove a exocitose induzida pelo cálcio, provando que a formação deste complexo tem um efeito regulatório no despoletar da secreção (Gatner *et al.*, 1997; Sollner *et al.*, 1993; Zhenyu *et al.*, 2004) (Figura 2.3).





**Figura 2.3.** Modelo hipotético da interacção da maquinaria SNARE na secreção plaquetária.

(Adaptado de Reed, 2000)

As proteínas Rab, que constituem uma família de GTPases de baixo peso molecular, também exercem um papel fundamental na secreção plaquetária, uma vez que contribuem para o direccionamento e ligação das vesículas à membrana plasmática (Karniguan *et al.*, 1993; Fitzgerald & Reed, 1999). As plaquetas possuem um número elevado de proteínas Rab que incluem as Rab 1, 3b, 4, 6, 8, 11, 27 e 31. Contudo, quando as plaquetas são activadas com trombina, as Rab 3b, 6 e 8 são fosforiladas, o que sugere que estas proteínas desempenham nas plaquetas um papel imprescindível no desencadeamento dos mecanismos de secreção (Reed *et al.*, 2000; Flaumenhaft, 2003).

A maioria das patologias associadas à secreção plaquetária é caracterizada pela ausência de grânulos ou do seu conteúdo. Uma das doenças mais frequentes é a síndrome de Gray ( $\alpha$ -SPD), caracterizada fundamentalmente pela redução acentuada de grânulos  $\alpha$ , podendo ainda apresentar diminuição de lisossomas e grânulos densos bem como uma tendência variável para a ocorrência de hemorragias. Os megacariócitos de indivíduos portadores de  $\alpha$ -SPD contêm pequenas vesículas anormais derivadas de um precursor granular  $\alpha$  associado ao complexo de Golgi (Breton-Gorius *et al.*, 1981). Nestes doentes, a fracção proteica libertada pelos grânulos  $\alpha$  também se encontra diminuída, nomeadamente a  $\beta$ -tromboglobulina. Adicionalmente, pode ainda ocorrer o comprometimento dos mecanismos de armazenamento dos grânulos  $\alpha$  ou a sua libertação prematura. Alguns pacientes com  $\alpha$ -SPD expressam níveis aumentados de P-selectina na membrana plaquetária, após activação celular, o que sugere que o defeito subjacente a esta doença se encontra no transporte do conteúdo dos grânulos através do complexo de Golgi e não necessariamente na exocitose e fusão membranar (Rosa *et al.*, 1987).

Em alguns pacientes foi reportada a combinação de  $\alpha$ - e denso- SPD, cujas causas moleculares permanecem ainda desconhecidas. A síndrome denso-SPD é bastante heterogénica, apresentando-se como uma alteração isolada ou associada a patologias

como a síndrome *Chediak-Higashi* e *Hermansky-Pudlak* (HPS<sup>1</sup>) que afectam a pigmentação e outros parâmetros fisiológicos (Gunay-Aygun *et al.*, 2004; Di Pietro *et al.*, 2005).

As recentes descobertas no estudo da secreção plaquetária e nas patologias originadas por alterações neste processo, irão contribuir para a compreensão das vias moleculares envolvidas no desenvolvimento granular dos megacariócitos e para o entendimento do transporte vesicular noutras células secretoras.

### 3. Participação das Plaquetas em Processos Fisiológicos e Patológicos

Para além do papel imprescindível que desempenham na hemostase primária, as plaquetas participam em inúmeros processos fisiológicos e patológicos, que incluem a inflamação, cicatrização, trombose, remodelação tecidual, metastização tumoral e imunidade inata. A grande variabilidade funcional deve-se, em parte, à capacidade que as plaquetas têm em estabelecer interacções com outras células e libertar moléculas que participam em processos quimiotáticos, angiogénicos, de degradação da matriz extracelular e de regulação de múltiplas vias de sinalização de vários tipos celulares (Lawrence *et al.*, 2010). As plaquetas também possuem vários receptores para complexos do sistema de complemento, que participam nos mecanismos de defesa inata, nomeadamente o complexo C5b-9 que actua sobre um receptor específico, particularmente activo em determinar a expressão de actividade pró-coagulante e a formação de micropartículas (Halkiet *et al.*, 1991).

Existe ainda alguma controvérsia em considerar as plaquetas como verdadeiros fagócitos (macrófagos e granulócitos), uma vez que apresentam algumas das suas características, como a presença de produtos lisossomais no citoplasma, que podem ser libertados, produtos metabólicos que medeiam o processo inflamatório e a capacidade de interagirem com vírus, bactérias e alguns parasitas. Contudo, a participação das plaquetas na inflamação é indiscutível, uma vez que após a sua activação, libertam múltiplos factores inflamatórios que atraem os leucócitos e estimulam o crescimento e reparação do vaso lesado. Entre os factores inflamatórios libertados encontram-se as RANTES (*Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted*, CCL5), CXCL5, CCL3 e PF4. Pelo seu envolvimento na inflamação pulmonar, foi sugerida a

---

<sup>1</sup> HPS – Patologia autossómica recessiva caracterizada pela carência de pigmentação nos olhos e pele.

participação das plaquetas na asma, através da observação de agregados plaquetários na superfície do lúmen das vias aéreas danificadas destes pacientes. Alguns estudos demonstram ainda a expressão da P-selectina na superfície das plaquetas, envolvida na mobilização de eosinófilos e na união destas células ao endotélio vascular (vonHundelshausen *et al.*, 2007; Gleissner *et al.*, 2008).

Do ponto de vista patológico, a activação plaquetária indesejada tem sido fundamentalmente associada à formação de trombos arteriais. Os eventos trombóticos, mediados não só pelas plaquetas, mas por múltiplas células, como as endoteliais ou os neutrófilos, são desencadeados por lesões vasculares patológicas, como as fissuras das placas ateroscleróticas, condição que conduz à resposta inflamatória. Por outro lado, as lesões ateroscleróticas conduzem a um estreitamento dos vasos, que promove a acumulação de plaquetas e a interacção com diversos elementos celulares (Alberto *et al.*, 2005).

Recentemente, as plaquetas foram implicadas na etiologia de várias neuropatologias, não só no acidente vascular cerebral mas também na esclerose múltipla, onde o estudo da interacção dos leucócitos com células endoteliais demonstrou que as plaquetas destes pacientes estão envolvidas na regulação destas interacções (Lawrence *et al.*, 2010).

A actividade plaquetária está ainda directamente envolvida na metastização tumoral, devido à formação de agregados plaqueta-célula tumoral que facilitam a sua disseminação e adesão ao endotélio vascular (Mehta, 1985). As próprias células tumorais podem induzir directamente a activação e agregação plaquetária, uma vez que produzem trombina e libertam ADP. As plaquetas têm ainda a capacidade de modular a proliferação da célula tumoral, através da libertação de enzimas proteolíticas e de factores de crescimento derivados das plaquetas que, em situações normais, promovem a migração e proliferação de células como leucócitos e fibroblastos (Kakkar *et al.*, 2002; JiuHong *et al.*, 2003).

Estudos recentes, reportam ainda a capacidade que as plaquetas têm de libertarem selectivamente dos grânulos  $\alpha$ , estimuladores ou inibidores angiogénicos, fundamentais para a progressão tumoral (Cevi *et al.*, 2008; Klement *et al.*, 2009). Assim, o estudo do proteoma plaquetário e a identificação de biomarcadores das plaquetas poderia ser útil na detecção precoce e monitorização terapêutica, fundamental para a sobrevivência dos pacientes com cancro (Pietramaggiore *et al.*, 2008). A capacidade para modular o secretoma plaquetário através da manipulação de receptores activados por protease pode conferir novas oportunidades para a investigação, nomeadamente no

desenvolvimento de estratégias terapêuticas que promovam ou inibam a angiogénese (Fujimoto *et al.*, 2010; Almong & Klement, 2010). Actualmente, são administrados com sucesso agentes antiplaquetários no tratamento da metastização tumoral, como os antagonistas da GPIIb/IIIa, que demonstraram inibir a adesão das células tumorais e a agregação plaquetária induzida pelas células tumorais (Sulkes, 2010).

#### **4. As Plaquetas como Alvo Terapêutico**

##### **4.1. Agentes Antiplaquetários**

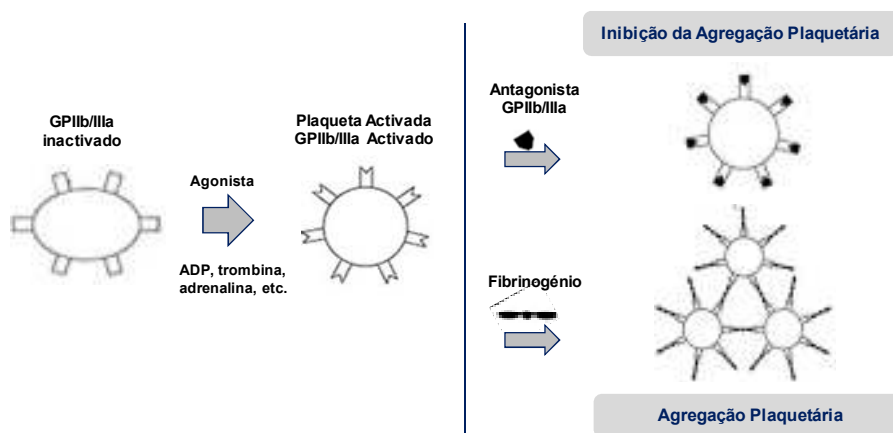
A partir do momento em que as plaquetas foram implicadas na patogénese das doenças cardiovasculares, verificou-se um aumento da utilização de anticoagulantes/antiplaquetários no tratamento farmacológico destas doenças, especialmente da síndrome coronária aguda. Nos últimos 10 anos, as estratégias terapêuticas adoptadas para a inibição da activação das plaquetas incluem fundamentalmente: inibidores das ciclooxigenases (Aspirina); inibidores de fosfodiesterases III e V (Cilostazol e Dipyridamol); bloqueadores do receptor do ADP, P2Y<sub>12</sub> (Clopidogrel, Prasugrel e Ticlopidina); bloqueadores da GPIIb/IIIa (Abciximab, Eptifibatide e Tirofiban) e activadores da óxido nítrico sintase (Triflusal). Têm sido efectuados vários estudos com o intuito de otimizar a aplicação destes antiplaquetários bem como avaliar as potenciais combinações de diferentes fármacos de forma a melhorar a sua acção terapêutica (Ferguson James *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2009; Butt *et al.*, 2010).

##### **4.1.1. Antagonistas da GPIIb/IIIa**

Uma vez que a agregação plaquetária é um evento crítico na reparação vascular, os compostos terapêuticos que bloqueiam a GPIIb/IIIa, receptor do fibrinogénio activado, previnem a acumulação de um grande número de plaquetas no local da lesão vascular. Efectivamente, estudos demonstram que a terapia à base de bloqueadores da GPIIb/IIIa é mais eficaz do que a Aspirina na redução de eventos vasculares e na diminuição da mortalidade em pacientes com síndrome coronária aguda (Ronner *et al.*, 2002).

Entre os inibidores mais específicos da GPIIb/IIIa encontra-se o Eptifibatide (Integrilin Therapeutics, Inc. Schering-Plough Corporation), um heptapeptídeo cíclico que, em vez de conter a sequência arginina-glicina-ácido aspártico, responsável pelo reconhecimento do local de ligação da GPIIb/IIIa na plaqueta, contém a sequência lisina-

glicina-ácido aspártico, funcionando como antagonista competitivo do fibrinogénio (Figura 2.4) (Coller *et al.*, 1997; Eric, 1999).



**Figura 2.4.** Mecanismo de acção dos antagonistas da GPIIb/IIIa.

(Adaptado de Shuldiner *et al.*, 2001)

Este fármaco tem sido amplamente utilizado em situações de isquemia coronária, que incluem, intervenção coronária percutânea, enfarte agudo do miocárdio e angina instável, tendo-se observado uma redução das complicações isquémicas agudas sem risco aumentado de efeitos adversos (Michelson *et al.*, 2001). Com uma constante de dissociação de 120 nM, tal como o Tirofiban, o Eptifibatide é selectivo para a GPIIb/IIIa não demonstrando qualquer reactividade para o  $\alpha v\beta 3$ . No IMPACT-II (*Integrilin to Minimize Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis-II*), a inibição de mais de 80 % da agregação plaquetária é conseguida através da administração de 135  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de Eptifibatide seguido de uma perfusão contínua de 0,75  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (durante 20 a 24 horas) (IMPACT-II Investigators, 1997). Contudo, Phillips *et al.* (1997) demonstraram em estudos *in vitro*, que o efeito das doses aplicadas era substancialmente sobrestimado, pelo uso convencional de anticoagulantes quelantes de cálcio. Assim, a concentrações de cálcio fisiológicas, a inibição plaquetária conseguida era de apenas 30 a 50 %, pelo que, para sangue não citratado, a maior percentagem de inibição foi alcançada após administração de 180  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  seguido de uma perfusão de 2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (Andrew *et al.*, 2001; James *et al.*, 2001; Eli *et al.*, 2001; Dalby *et al.*, 2004).

#### 4.2. A Maquinaria de Secreção como Alvo Terapêutico

A elucidação do papel que a maquinaria de secreção plaquetária desempenha na vasculatura pode ser uma mais-valia no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Evidências recentes demonstram que as proteínas cinases C, ao regularem o processo de secreção, exercem um papel fundamental na contracção cardíaca, aterosclerose, trombose arterial e tumorigénese, o que as torna um alvo terapêutico em várias alterações patológicas (Stein *et al.*, 2003; Gwenda *et al.*, 2009).

Contudo, abordagens terapêuticas recentes têm como alvo a modulação das proteínas Rab, implicadas na secreção, na qual exercem uma função reguladora em múltiplos processos fisiopatológicos. Assim, enquanto algumas patologias, caracterizadas pelo aparecimento de hemorragias, distúrbios na pigmentação, atraso mental, cegueira e neuropatia, resultam da perda directa da regulação exercida pelas GTPases Rab, a sobre-expressão destas proteínas está fortemente correlacionada com patologias do pulmão e tiróide bem como com o cancro da mama, fígado e próstata (Konopatskaya & Poole, 2010).

#### 4.3. Variabilidade Inter-individual na Resposta Antiplaquetária

Desde cedo se observou que a reactividade plaquetária na hemostase normal e no resultado patológico da trombose varia substancialmente de indivíduo para indivíduo (Gonzalez-Conejero *et al.*, 1998). Esta variabilidade, conhecida por dificultar a escolha do antagonista plaquetário e da dose a administrar, é fortemente determinada por factores ambientais e genéticos. Entre os factores ambientais mais comuns encontram-se a idade, sexo, hábitos tabagicos, exercício físico, efeitos hormonais, hiperlipidemia, depressão e suplementos vitamínicos. Contudo, actualmente os estudos clínicos têm dado particular ênfase à influência dos polimorfismos genéticos na reactividade plaquetária (Rozalski *et al.*, 2005). Porém, existem enormes discrepâncias entre os diferentes estudos que correlacionam determinados polimorfismos com o risco geral de trombose, e que poderão ser justificadas pelo número de pacientes estudados, etnia, viés na selecção dos pacientes e controlos, e variabilidade de factores ambientais (Falluji & Steinhubl, 2007). Apesar destas diferenças, são verificadas evidências consensuais para as seguintes variantes alélicas: integrina  $\beta 3\text{PI}^{\text{A2}}$ , GPIb  $\alpha \text{Met}^{145}$  e haplótipo GPIb  $\alpha^{-5}\text{C}$  e integrina  $\alpha_2^{807}\text{T}$ , que podem contribuir para o aumento da morbidade da doença trombótica (Gonzalez-Conejero *et al.*, 1998; Ardissino *et al.*, 1999).

Relativamente ao complexo proteico GPIIb/IIIa, imprescindível na etapa final de agregação plaquetária, sabe-se que a subunidade GPIIIa aparenta ser dimórfica na posição Leu -> <sup>33</sup>Pro que resulta de uma única transição nucleotídica C<sup>1565</sup> -> T. Este polimorfismo específico da plaqueta é conhecido por PI<sup>A1/A2</sup>. Desde que Weiss *et al.* (1996) sugeriram que os indivíduos com PI<sup>A2</sup> apresentam um maior risco de trombose arterial, têm sido descritos resultados contraditórios sobre o papel deste polimorfismo (Walter *et al.*, 1997). Enquanto alguns investigadores defendem que não existem diferenças na frequência da variante PI<sup>A1/A2</sup> entre indivíduos saudáveis e pacientes com enfarte do miocárdio e doença isquémica cardíaca (Wheeler *et al.*, 2002), outros demonstraram uma prevalência superior do alelo PI<sup>A2</sup> associada a estas alterações clínicas (Rozalski *et al.*, 2005). Curiosamente, alguns estudos indicam que os indivíduos homozigóticos PI<sup>A1/A1</sup> têm alguma tendência para a ocorrência precoce de aterosclerose e progressão rápida da doença arterial coronária estável, enquanto os indivíduos com o alelo PI<sup>A2</sup> têm maior tendência para complicações trombóticas (Bray *et al.*, 2001; O' Connor *et al.*, 2001).

De uma maneira geral, estudos demonstraram que o efeito inibitório de antagonistas da GPIIb/IIIa é menos eficiente nos indivíduos PI<sup>A2</sup> (Pascal *et al.*, 1999; Rozalski & Watala, 2002). Por outro lado, Michelson *et al.* (2000) demonstraram que os indivíduos heterozigóticos PI<sup>A1/A2</sup> são mais sensíveis ao Abciximab comparativamente a pacientes com outros genótipos. Contudo, a associação do efeito do Eptifibatide nos indivíduos portadores deste genótipo PI<sup>A1/A2</sup> ainda permanece ambígua (Vahid *et al.*, 2007). Assim, são necessários estudos adicionais que avaliem os locais polimórficos em genes hemostáticos de potencial interesse farmacológico, uma vez que a influência dos factores genéticos na reactividade natural das plaquetas parece determinante na acção de uma terapia efectiva com antiagregantes plaquetários.

## 5. Métodos de Avaliação da Função Plaquetária

Desde que se demonstrou que as plaquetas estavam envolvidas na patogénese de eventos aterotrombóticos, tem-se assistido a um contínuo e crescente progresso no estudo da função plaquetária. Assim, para além dos testes já padronizados, como a avaliação da agregometria ou dos tempos de hemorragia, tem-se observado um número crescente de estudos que utilizam abordagens metodológicas baseadas na citómica e na proteómica para avaliação da função plaquetária e dos mecanismos moleculares

subjacentes bem como para a monitorização da acção de terapias antiplaquetárias (Michelson *et al.*, 2004; Harrison, 2005).

### 5.1. Análise da Agregação Plaquetária

Em combinação com outras metodologias, a agregação plaquetária *in vitro* é comumente utilizada na avaliação da função plaquetária, nomeadamente, na monitorização do efeito de antiagregantes e na detecção de alterações funcionais como a trombostenia de *Glanzmann* ou a síndrome de *Bernard-Soulier*. Pode ainda ser utilizada no diagnóstico da doença de *vonWillebrand*, com a ristocetina como co-factor (Michelson *et al.*, 2004; Usman & Alice, 2007).

Os ensaios quantitativos de agregometria convencional, que seguem o princípio básico descrito há mais de 40 anos por Born *et al.* (1962), são efectuados com um agregómetro óptico, que regista alterações de transmissão de luz no plasma rico em plaquetas (PRP). Inicialmente, observa-se a diminuição na transmissão de luz após a activação com diferentes agonistas, devido à alteração da forma das plaquetas, de discóide a esferóide, e posteriormente um aumento deste parâmetro proporcionalmente à formação de agregados plaquetários (Born, 1964; Steinhubl *et al.*, 2001; Klouche, 2007).

Apesar de utilizada por rotina na avaliação da função plaquetária, a agregometria óptica de Born apresenta algumas limitações que incluem: a necessidade de preparação e de grandes volumes de amostra; a longa duração dos tempos de ensaio e a experiência técnica requerida na execução dos procedimentos metodológicos que variam entre os laboratórios, o que dificulta a comparação de resultados. Adicionalmente, esta análise não pode ser realizada em situações de trombocitopenia severa e o seu uso na monitorização terapêutica com a Aspirina é questionável (Posan *et al.*, 2003; Lennon *et al.*, 2004; Lakhey *et al.*, 2005).

A agregometria pode ser actualmente realizada em sangue total, sendo necessário para o efeito equipamento apropriado, permitindo reduzir não só o volume de amostra necessário ao ensaio, mas também o tempo requerido à preparação da amostra para análise das respostas de agregação plaquetária. Neste sentido, a partir de sangue total e simulando as condições fisiológicas, o RPFA (*Rapid Platelet Function Assay*) tem sido utilizado na determinação laboratorial da função plaquetária *in vitro*, sob uma metodologia turbidimétrica de alto fluxo, permitindo uma avaliação rápida e simples, que elimina em grande parte os factores interferentes observados na agregometria convencional (Lee *et al.*, 1999; Alberts, 2005).



## 5.2. Análise de Marcadores de Activação Plaquetária por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CMF) constitui uma ferramenta extremamente versátil na caracterização estrutural e funcional das plaquetas em condições fisiológicas e patológicas. Entre as inúmeras aplicações, a CMF é utilizada para: (i) determinar o estado de activação e reactividade plaquetária (através de alterações quantitativas de GP presentes na membrana plaquetária em repouso, a interacção leucócito-plaqueta e a expressão de micropartículas pró-coagulantes); (ii) diagnosticar doenças específicas (síndrome de *Bernard-Soulier*, trombostenia de *Glanzmann*, alterações na secreção plaquetária e trombocitopenia induzida por heparina [TIH]); (iii) monitorizar a acção de agentes antiplaquetários; (iv) monitorizar a trombopoiese (através da quantificação de plaquetas jovens e reticuladas); (v) controlar a qualidade e identificar contaminações leucocitárias em concentrados plaquetários; (vi) imunofenotipar plaquetas HPA-1a e detectar anticorpos anti-HPA-1a maternos e fetais; (vii) determinar IgG associado a plaquetas; (viii) contar plaquetas; e (ix) analisar parâmetros intracelulares envolvidos nas vias de transdução de sinal, como a mobilização de cálcio, pH intracelular, conteúdo de F-actina e teor de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Michelson *et al.*, 2007).

O potencial analítico da CMF reside na possibilidade de medir diversos parâmetros em dezenas de milhares de células individuais, em poucos segundos (aproximadamente 2000 células/segundo). Fundamentalmente, um citómetro de fluxo mede as propriedades de dispersão de luz da célula ou organelo subcelular, e a fluorescência emitida por constituintes de sondas de interesse. Assim, para além da informação obtida sobre o tamanho da célula, através da dispersão frontal de luz (FS – *Forward Scatter*), e a complexidade e textura celular, fornecida pela dispersão lateral de luz (SS – *Side Scatter*), com a utilização de sondas específicas é possível detectar e quantificar inúmeros parâmetros plaquetários (Givan *et al.*, 1992; Michelson, 1996; Schmitz, 1998).

Na análise de parâmetros bioquímicos de activação plaquetária, a CMF permite monitorizar as principais respostas funcionais das plaquetas, nomeadamente a mobilização de cálcio intracelular, detectado pela alteração da intensidade de fluorescência do marcador intracelular Fluo-4, que por ser um evento precoce e rapidamente reversível requer a realização do ensaio em modo cinético, em tempo real (Monteiro *et al.*, 1999 e 2003). Outros marcadores podem ser utilizados na análise de parâmetros intracelulares, como a dihidrorodamina 123 (DHR123), que avalia a formação de radicais livres e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e o BCECF e SNARF-1 que permitem a medição do pH intracelular (O'Connor, 2001). Sondas como a falacidina ou faloidina permitem avaliar a polimerização da G-actina em F-actina que ocorre após activação

plaquetária, com consequente alteração da forma das plaquetas, centralização dos grânulos e retracção do coágulo (Miki *et al.*, 1987). A anexina-V permite avaliar por CMF a expressão de uma superfície pró-coagulante, devido ao mecanismo de flip-flop dos fosfolípidos da membrana (predominantemente fosfatidilserina), enquanto o anticorpo monoclonal PAC-1 é utilizado para monitorizar a alteração conformacional do receptor do fibrinogénio activado (GPIIb/IIIa) (Ugarova *et al.*, 1993; Frojmovic, 1996; Jonathan *et al.*, 2002). Um processo fundamental que ocorre durante a activação plaquetária é a fusão das membranas dos grânulos  $\alpha$  com a membrana plasmática. As alterações na superfície da membrana decorrentes deste processo podem ser detectadas com os anticorpos específicos S12 e KC4 que reconhecem a glicoproteína P-selectina (CD62) ou com o anticorpo RUU-SP 1.77 que reconhece a GMP-33, ambas glicoproteínas da membrana dos grânulos  $\alpha$  (Ruf & Patshecke, 1995).

Contudo, à semelhança de outros ensaios laboratoriais, a utilização de plaquetas isoladas na realização de estudos funcionais é potencialmente susceptível a artefactos inerentes ao procedimento de separação das plaquetas. Assim, a aplicação da CMF a amostras de sangue total, introduzida por Shattil *et al.* (1987) e continuamente otimizada por outros investigadores (Monteiro *et al.*, 2003; Michelson *et al.*, 2005), foi um passo marcante no âmbito da investigação clínica. Desta forma, as plaquetas são directamente analisadas, sem serem separadas dos leucócitos e eritrócitos (que influenciam a activação plaquetária), sendo evitada a activação artefactual bem como a perda de subpopulações plaquetárias (Monteiro *et al.*, 2003). Para além das vantagens enumeradas, a CMF permite ainda a detecção de um largo espectro de modificações de antígenos de superfície da membrana plaquetária, permite a detecção de subpopulações tão pequenas como 1 % de plaquetas parcialmente activadas e requer um volume mínimo de amostra (aproximadamente 5  $\mu$ L) (Michelson *et al.*, 2007).

Entre as desvantagens desta metodologia encontram-se os elevados custos de aquisição e manutenção dos citómetros de fluxo, a necessidade de um operador especializado na realização dos procedimentos e o processamento das amostras num curto espaço de tempo, de modo a evitar a activação *ex vivo*, particularmente importante nos estudos funcionais. Por outro lado, o reduzido tamanho das plaquetas dificulta a distinção entre os sinais de FS e SS e o ruído de fundo, pelo que a aquisição dos dados deve ser realizada com amplificação logarítmica. No entanto, a utilização de marcadores específicos de plaquetas, permite contornar esta limitação na maior parte das aplicações. (O'Connor *et al.*, 2001; Michelson *et al.*, 2007)

### 5.3. Análise do Genoma Plaquetário

Diversas alterações patológicas relacionadas com a hemostase são consideradas monogénicas, logo a simples alteração num único gene (causada na maioria das vezes por uma mutação pontual) pode ser suficiente para o desenvolvimento de patologias de natureza hemorrágica como as hemofilias, ou que predispõem à trombose como é caso da mutação do factor V, designada de Factor V de Leiden. Para além da existência de polimorfismos funcionais associados ao aumento do risco da ocorrência de eventos trombóticos e hemorrágicos, qualquer alteração num gene que codifique uma molécula que directa ou indirectamente afecte as proteínas do sistema hemostático (regule a sua expressão, correcta estabilidade, implicadas em modificações pós-traducionais, entre outras) irá desempenhar um papel relevante no desenvolvimento destas doenças (Iain *et al.*, 2005; García *et al.*, 2007). Deste modo, na caracterização de muitas patologias plaquetárias tem sido analisada a expressão de milhares de genes em simultâneo utilizando tecnologias de *microarrays* e *serial analysis of gene expression* (SAGE) (Dmitri *et al.*, 2006). Os *microarrays* constituem um sistema rápido e semi-quantitativo na detecção de mRNA (na forma de cDNA) proveniente das plaquetas, através da hibridização com sondas de DNA imobilizadas nos *arrays*. O número de estudos com *microarrays* e mRNA plaquetário é limitado mas os poucos trabalhos que foram publicados sugerem que dos, aproximadamente, 22.000 genes identificados no genoma humano, 3.000 a 6.000 dos transcriptos de mRNA encontram-se presentes nas plaquetas (Holloway *et al.*, 2002; Gnatenko *et al.*, 2003).

Para além dos transcriptos mais abundantes que já foram caracterizados nas plaquetas (GPIIb, GPIIb e PF4), as análises por *microarray* sugerem que o transcriptoma das plaquetas encontra-se maioritariamente relacionado com o metabolismo, receptores e actividade de sinalização e resposta inflamatória e imunitária. Recentemente, foram identificados transcriptos previamente não associados às plaquetas, como a neurogranina (um substrato da PKC) e a clusterina (inibidor da lise do complemento), cuja expressão plaquetária se encontra reduzida em pacientes com Lúpus Eritematoso (Gnatenko *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

Por outro lado, a metodologia de SAGE permite a determinação quantitativa dos níveis de mRNA para a vasta maioria dos genes expressos, conferindo uma vantagem sobre os *microarrays* que dependem da eficiência de hibridização. Contudo, quando comparada com os *microarrays*, a análise dos dados SAGE bem como o trabalho laboratorial é mais demorado. No método de SAGE são utilizadas sondas *tags*, de sequência curta (normalmente 14 bp) que se ligam a uma posição definida na molécula

de mRNA, permitindo a sua identificação. Posteriormente, uma reacção de sequenciação simples permite a identificação em série de múltiplos *tags* (Denis *et al.*, 2005). Dado que as plaquetas possuem um grande número de mitocôndrias, 89 % das 2.033 sondas SAGE detectadas eram de origem mitocondrial, enquanto os restantes 11 % correspondiam a genes específicos das plaquetas. Assim, dado o excesso de transcriptos mitocondriais, mais de 300.000 sondas *tags* foram necessárias para a completa caracterização do transcriptoma plaquetário. Uma técnica alternativa é o SAGE de subtracção, que pode permitir a caracterização completa de transcriptos não mitocondriais. Contudo, a utilização de *arrays* completos de expressão génica e o desenvolvimento de tecnologias de sequenciação *high-throughput*, parecem vir a superar num futuro próximo o método de SAGE (Velculescu *et al.*, 1995; Sausville *et al.*, 2004; Hoheisel *et al.*, 2006).

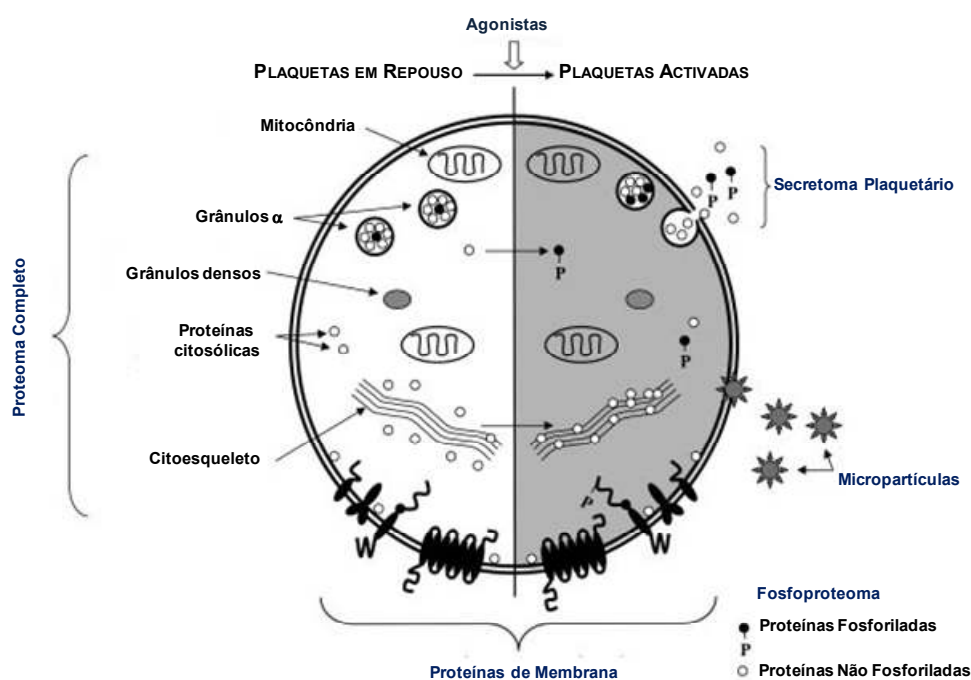
Contudo, apesar de ambas as metodologias fornecerem longas listas de transcriptos e níveis relativos de expressão, não fornecem informação sobre a localização, as interacções ou as modificações pós-traducionais (PTMs) das proteínas codificadas, tornando limitada a análise do transcriptoma ao nível da função celular.

#### 5.4. Análise do Proteoma Plaquetário

Nos últimos anos, os avanços científicos e tecnológicos verificados na proteómica têm sido uma mais-valia, comparativamente com a genómica, para a compreensão da bioquímica das plaquetas e para a caracterização de patologias relacionadas com a hemostase. Efectivamente, para além da identificação e quantificação das proteínas expressas, é ainda possível obter informações sobre a estrutura e função das proteínas identificadas, as modificações pós-traducionais, as interacções com outras proteínas e a localização celular (Prentice *et al.*, 2004; McRedmond *et al.*, 2004). Adicionalmente, para além da elevada sensibilidade das técnicas de análise do proteoma, as plaquetas podem ser facilmente isoladas e purificadas o que facilita a posterior detecção de importantes proteínas de regulação. Contudo, para além das inúmeras vantagens da proteómica, a possibilidade de contaminação com proteínas provenientes de outras células sanguíneas continua a ser uma limitação, bem como a quantidade de amostra requerida dada a incapacidade de amplificar as proteínas (ao contrário do que acontece com os ácidos nucleicos) (Gravel *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos recentes demonstraram que o proteoma das plaquetas é mais complexo do que inicialmente previsto, uma vez que, para além das proteínas codificadas

por genes plaquetários específicos, as plaquetas têm a capacidade de armazenar proteínas com origem extracelular e que apresentam funções importantes na hemostase e inflamação (Corral *et al.*, 2005). Até à data, foram identificadas entre 760 a 2.300 proteínas diferentes nas plaquetas, associadas ao citoesqueleto, à sinalização celular, ao processamento proteico, a receptores de membrana, entre outras. No entanto, estima-se que o número real de proteínas presentes nas plaquetas seja superior a 10.000 (García *et al.*, 2008). Para além da catalogação global das proteínas presentes nas plaquetas em repouso, a análise do proteoma das plaquetas envolve ainda a pesquisa das PTMs das proteínas, importantes na regulação de processos específicos da função plaquetária, tais como as respostas iniciais que desencadeiam a adesão, as alterações produzidas pela agregação, secreção de proteínas e sinalização intracelular (Prentice *et al.*, 2004; McRedmond *et al.*, 2004) (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Proteoma e “subproteomas” (proteínas de membrana, secretoma plaquetário, micropartículas e PTMs) das plaquetas.

(Adaptado de Dmitri *et al.*, 2006)

De uma maneira geral, a análise do proteoma das plaquetas pode envolver o fracionamento celular, a separação das proteínas, digestão enzimática e identificação das proteínas. Os avanços na bioinformática e na tecnologia de espectrometria de massa (MS), com a introdução de fontes de ionização como o MALDI (*matrix-assisted laser*

*desorption/ionization*) ou ESI (*electrospray ionization*), têm permitido uma análise robusta e automatizada do proteoma plaquetário (Cristea *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2007).

Utilizada há mais de 40 anos no estudo da biologia plaquetária, a electroforese, nomeadamente a bidimensional, 2-D, possibilitou a separação de muitas proteínas plaquetárias posteriormente identificadas por espectrometria de massa *tandem*. A combinação com técnicas de pré-fraccionamento como a precipitação selectiva, a purificação de proteínas individuais ou complexos proteicos por cromatografia, permitiu aumentar o número de proteínas identificadas (Fey & Larsen, 2001; Gorg, 2002; Righetti *et al.*, 2003). Assim, no estudo pioneiro de Marcus *et al.* (2000), efectuado com 2D-MALDI/TOF foram identificadas 186 proteínas plaquetárias, obtendo o primeiro mapa do proteoma das plaquetas num intervalo de pI de 3 a 10. A este primeiro trabalho, seguiram-se os estudos realizados pelos investigadores do *Glycobiology Institute University of Oxford* (O’Neil *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004), que entre 2002 e 2004 publicaram a caracterização mais exaustiva conhecida até à data sobre o proteoma plaquetário. Para o efeito utilizaram 2-D em gradientes estreitos de pH (4-5, 5-6, 4-7 e 6-11), e posterior análise por LC-MS/MS, tendo identificado 2000 proteínas diferentes. Actualmente, como alternativa à utilização de 2-D foi desenvolvida a metodologia designada *combined fractional diagonal chromatography* (COFRADIC), que se baseia na utilização de uma reacção de modificação que altera o tempo de retenção de determinados péptidos (N-terminal, com cisteínas ou metioninas) na coluna de fase reversa de um nano-HPLC, antes da análise por espectrometria de massa *tandem*. Esta metodologia, é aproximadamente 100 vezes mais sensível do que a análise baseada em 2-D, podendo ser realizada de uma maneira totalmente automatizada (Gevaert *et al.*, 2003). A tecnologia de COFRADIC permitiu assim a identificação de um total de 641 proteínas plaquetárias, entre as quais se destacaram um elevado número de proteínas de membrana (30 %) (Martens *et al.*, 2005).

Independentemente da abordagem metodológica, a análise do perfil proteico das plaquetas permite obter uma perspectiva global dos mecanismos fisiopatológicos, sendo crucial na pesquisa de marcadores de diagnóstico, prognóstico e de monitorização terapêutica de doenças trombóticas e hemorrágicas (Corral *et al.*, 2005; García, 2008).

#### **5.4.1. Proteómica Aplicada ao Estudo do Secretoma das Plaquetas**

Mais do que a análise global do proteoma, actualmente, subsiste um interesse particular no estudo da fracção proteica libertada pelos grânulos especializados das plaquetas. Efectivamente, a libertação selectiva de péptidos e proteínas durante a adesão

a vasos danificados e subsequente activação plaquetária é responsável pela activação de outras plaquetas, cicatrização e resposta inflamatória, estando ainda implicada na angiogénese, crescimento e adesão celular (Wagner *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005). Assim, a identificação do secretoma plaquetário poderá contribuir para a descoberta de novos biomarcadores e alvos terapêuticos que permitam um melhor diagnóstico e tratamento das doenças cardiovasculares (Sander *et al.*, 2009; Judith *et al.*, 2007).

O estudo de Coppinger *et al.* (2004) foi pioneiro na caracterização do secretoma das plaquetas. Para o efeito, estes investigadores utilizaram cromatografia líquida bidimensional (LC/LC) acoplada a MS/MS. Com esta abordagem metodológica identificaram 81 proteínas diferentes, algumas das quais não tinham sido até então associadas às plaquetas, sendo de salientar a secretogranina III, a ciclofilina A e a calumenina que foram especificamente identificadas em lesões arterioscleróticas humanas. Este número de proteínas identificadas no secretoma das plaquetas foi aumentado em estudos posteriores. Por exemplo, Piersma *et al.* (2009) identificaram 716 proteínas no secretoma das plaquetas utilizando uma tecnologia de identificação proteica multidimensional (MudPIT), que acopla HPLC multidimensional (LC/LC) com a espectrometria de massa *tandem* (MS/MS). Destas proteínas identificadas, apenas 5 % tinham sido já descritas por Coppinger *et al.* (2004) e 45 % encontravam-se associadas a células secretoras. Os restantes 55 % correspondiam a proteínas identificadas nos grânulos  $\alpha$  e nas micropartículas plaquetárias. Relativamente aos processos biológicos nos quais estão envolvidas, a maioria das proteínas identificadas intervêm no metabolismo, mobilidade celular, regulação de processos biológicos e diferenciação celular.

Mais do que identificar um grande número de proteínas, tem-se observado recentemente uma preocupação em avaliar quantitativamente as alterações proteicas induzidas, por exemplo, por agentes antiplaquetários. Para o efeito, foram criadas tecnologias que permitem a comparação directa entre proteomas celulares, como o *isotope-coded affinity tags* (ICATs) e *isobaric tags* (iTRAQs) acopladas a LC-MS/MS (O'Connor *et al.*, 2010). Estas abordagens envolvem a marcação dos péptidos com sondas isobáricas e processos de dissociação (CID), onde ocorre a fragmentação dos péptidos induzida pelas colisões entre os iões precursores e as moléculas de um gás neutro. Posteriormente, os rácios das áreas dos picos dos iões reportados são utilizados para quantificar os péptidos. A tecnologia de iTRAQs é mais utilizada do que a de ICATs, que apenas detecta péptidos que contêm cisteína, não sendo por isso adequada para a

detecção de péptidos com modificações pós-traducionais (Mann *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001).

Apesar dos avanços metodológicos e do número crescente de trabalhos científicos de avaliação da função plaquetária, ainda são escassos os estudos sobre o efeito de agentes antiplaquetários no secretoma das plaquetas. Até à data apenas se encontra descrito por Coppinger *et al.* (2009), o efeito da aspirina nos diferentes perfis de proteínas libertadas pelas plaquetas, após a estimulação com ADP, colagénio e TRAP. Estes autores, utilizando marcação com iTRAQs e análise por nano-LC MS/MS, identificaram 146 proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com os diferentes agonistas. Adicionalmente, a diminuição do teor proteico agonista-dependente libertado pelas plaquetas pré-tratadas com aspirina, foi sobretudo notório para as proteínas trombospondina, PF4, proteína básica das plaquetas, factor indutor de proteólise, transferrina e proteína Sparc. Estes autores demonstraram a aplicação de técnicas de proteómica com elevada resolução e precisão ao estudo de agentes antiplaquetários, nomeadamente na caracterização do secretoma das plaquetas em resposta a vários agonistas e na presença ou ausência de aspirina (Coppinger *et al.*, 2009).

A integração dos resultados obtidos destes estudos com a informação da análise genómica e funcional em condições patofisiológicas é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da actividade plaquetária. Só assim será possível a elaboração de estudos consistentes, reprodutíveis e que ofereçam resultados relevantes para o tratamento de doenças relacionadas com a hemostase.

## 6. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo geral o estudo do efeito do Eptifibatide nas respostas de activação plaquetária, utilizando uma abordagem citómica e proteómica. Como objectivos específicos para o desenvolvimento deste estudo pretendeu-se:

- i) Avaliar o efeito do Eptifibatide na funcionalidade das plaquetas, utilizando o método clássico de agregometria óptica e a análise de vários parâmetros bioquímicos de activação plaquetária, por citometria de fluxo, que incluem: mobilização de cálcio intracelular; alterações morfológicas; expressão de receptores do fibrinogénio activados (GPIIb/IIIa activada); expressão da proteína dos grânulos  $\alpha$ , P-selectina (CD62), na superfície plaquetária; detecção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e determinação da polimerização da actina;



- ii)** Optimizar uma metodologia para o isolamento das plaquetas e obtenção de secretoma plaquetário;
- iii)** Estabelecer o perfil proteico do secretoma das plaquetas utilizando SDS-PAGE-MS/MS e 2D-PAGE-MS/MS;
- iv)** Avaliar o efeito do Eptifibatide na fracção proteica libertada pelas plaquetas.

---

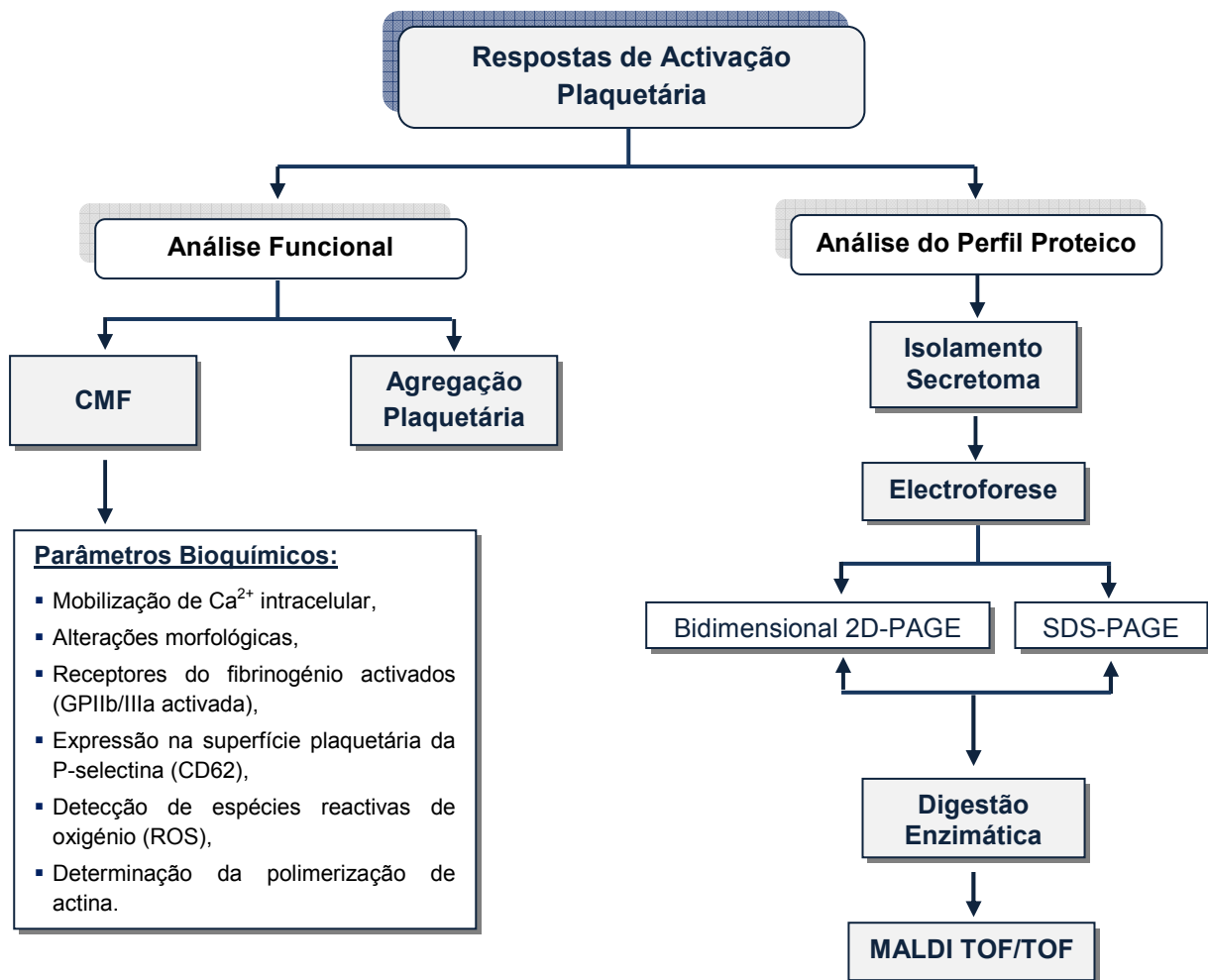
### **III – Material e Métodos**

---

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Desenho Experimental

No sentido de concretizar os objectivos propostos para este estudo (Capítulo II) delineou-se um desenho experimental que é apresentado esquematicamente na figura 3.1.



**Figura 3.1.** Esquema representativo da sequência de procedimentos técnicos utilizados na análise de parâmetros bioquímicos de activação plaquetária (abordagem citómica) e na análise das proteínas libertadas pelas plaquetas (abordagem proteómica), em resposta ao Eptifibatide.

As abordagens metodológicas aplicadas ao estudo do efeito do Eptifibatide, na activação plaquetária, encontram-se descritas pormenorizadamente nos pontos seguintes.

## 2. Grupo de Estudo

Para estudar o efeito do Eptifibatide (Integrilin Therapeutics, Inc. Schering-Plough Corporation/USA) no perfil de proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina (0,5U/mL), efectuaram-se colheitas de sangue total num grupo de 15 indivíduos que se apresentavam em jejum no momento da colheita. De modo a adquirir uma quantidade de amostra suficiente para a análise do secretoma plaquetário (Figura 3.1) prepararam-se *pools* de amostras de cinco dadores, num total de três amostras independentes.

Paralelamente, num grupo de 5 indivíduos foi avaliada a funcionalidade das plaquetas em amostras de sangue total sem qualquer tratamento e após tratamento com diferentes concentrações de Eptifibatide (0-0,1 µg/mL).

Os indivíduos que participaram no estudo obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: indivíduos jovens ( $25 \pm 9$  anos), de ambos os sexos, sem qualquer patologia reconhecida da hemostase, pessoal ou familiar, e sem medicação anti-plaquetária nas duas semanas precedentes à colheita de sangue.

## 3. Recolha e Processamento das Amostras

As colheitas de sangue total foram efectuadas de modo a evitar a activação plaquetária artefactual. Assim, as amostras de sangue foram colhidas sem garrote, na veia antecubital, com uma agulha de 19 gauges. Os primeiros 2,5 mL foram descartados e, para a realização dos estudos funcionais, foram recolhidos 4,5 mL de sangue, directamente para um tubo com 0,5 mL de citrato de sódio 3,8 % (m/v). Para a análise do perfil proteico efectuaram-se colheitas de 45 mL de sangue para um tubo contendo 5 mL de ACD (38 mM ácido acético, 74,8 mM de citrato de sódio e 123 mM de glicose). Após a colheita, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (22 °C), e o seu processamento foi iniciado na hora seguinte.

As amostras de sangue total foram diluídas em tampão *Tyrode* modificado (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 5,5 mM glucose, 0,35 % BSA) pH 7,4), depois de filtrado, na proporção de 1:10, como é geralmente recomendado para estudos funcionais das plaquetas (Michelson, 1996). No processamento das amostras utilizadas no estudo do perfil proteico, utilizou-se tampão *Tyrode* modificado sem BSA.

## 4. Análise Funcional

### 4.1. Análise Multiparamétrica por Citometria de Fluxo

A análise da activação das plaquetas, efectuada por citometria de fluxo foi, como referido anteriormente, realizada em amostras de sangue total previamente diluído, uma vez, que para além de se analisarem as plaquetas no seu ambiente fisiológico, a manipulação das amostras é mínima. Assim, evita-se a activação artefactual, frequentemente inerente aos procedimentos utilizados no isolamento das plaquetas.

#### 4.1.1. Pré-tratamentos das Amostras com Eptifibatide

As amostras de sangue total diluído foram incubadas com concentrações crescentes de Eptifibatide (0,0001; 0,001; 0,01; 0,05 e 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 15 min., à temperatura ambiente. De modo a avaliar a activação plaquetária sem a interferência da variável em estudo, foram processadas, em simultâneo, amostras de sangue total diluído sem qualquer pré-tratamento com Eptifibatide.

#### 4.1.2. Determinação de Parâmetros Bioquímicos de Activação Plaquetária

Para avaliar a activação basal das plaquetas e a activação induzida por diferentes agonistas (trombina, ADP, colagénio e TRAP), antes e após o tratamento com Eptifibatide, foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos, utilizando marcadores fluorescentes específicos: (i) mobilização de cálcio intracelular; (ii) alterações morfológicas; (iii) expressão de receptores do fibrinogénio activados (GPIIb/IIIa activada); (iv) expressão na superfície plaquetária da GP dos grânulos  $\alpha$ , P-selectina (CD62); (v) detecção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e (vi) determinação da actina polimerizada relacionada com a reorganização do citoesqueleto.

A preparação do citómetro de fluxo (EPICS XL Beckmann-Coulter) utilizado para a aquisição dos dados obedeceu a todas as operações necessárias para efectuar medições com as seguintes características: dispersão frontal de luz (FS- *Forward Light Scatter*), relacionado com o tamanho da célula; dispersão lateral de luz, em ângulos de  $90^\circ$  (SS- *Side Light Scatter*) e emissão de fluorescência por parte das células.

Todas as aquisições foram realizadas utilizando para cada parâmetro o protocolo específico e em modo logarítmico. Este modo de amplificação aumenta a resolução e comprime a escala em casos de heterogeneidade, tornando-o o modo de análise de

eleição para as plaquetas e células muito pequenas com heterogeneidade estrutural e funcional. Os dados foram recolhidos em forma de histogramas e em “modo de lista”. Este tipo de aquisição permitiu a análise posterior dos dados, através da utilização do *software* System II™ (Beckmann-Coulter, Hialeah, FL) tornando possível recombinação de parâmetros obtidos e redefinir diferentes regiões de análise.

#### 4.1.2.1. DETERMINAÇÃO CINÉTICA DA MOBILIZAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR E DETERMINAÇÃO CINÉTICA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS PLAQUETAS

As amostras de sangue total diluído, com e sem pré-tratamento com Eptifibatide, foram incubadas no escuro e a 37°C, durante 15 min. com 2,5 µL de Fluo-4 (Invitrogen Molecular Probes, Oregon). Este fluorocromo permite monitorizar a mobilização de cálcio intracelular, uma vez, que as formas *acetoximetil ester* (AM) entram nas células intactas e são hidrolisadas por esterases intracelulares específicas. Assim, dentro da célula o fluorocromo une-se ao cálcio livre, alterando a sua conformação, o que determina um aumento da emissão de fluorescência, no mesmo comprimento de onda (Minta *et al.*, 1989).

Posteriormente, amostras de 12,5 µL foram incubadas, durante 15 min., no escuro e à temperatura ambiente, com 2,5 µL de anticorpo CD41-PE (Immunotech, France), que detecta o complexo GPIIb/IIIa, constituinte específico da membrana plaquetária. Nas amostras destinadas à estimulação com trombina foi, ainda, adicionado o tetrapéptido sintético GPRP (Sigma Chemical CO., St. Louis MO), na concentração final de 2,5 mM, de forma a inibir a polimerização de fibrina (Michelson *et al.*, 1991). Decorrido o período de incubação, as amostras foram diluídas com 500 µL de tampão *Tyrode* e procedeu-se aos ensaios cinéticos. Depois de determinada a fluorescência basal de Fluo-4 (log FL1) da população plaquetária, durante aproximadamente 20 segundos efectuou-se uma pausa na aspiração das amostras e adicionaram-se 25 µL dos respectivos agonistas (trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5µM ou TRAP 15 µM (Sigma Chemical CO., St. Louis MO) (Monteiro *et al.*, 2003). A aquisição foi reiniciada e as alterações no log FL1 foram registadas ao longo do tempo. Em simultâneo, foram analisadas as alterações morfológicas da população plaquetária, através da monitorização de sinais de dispersão de luz, lateral (SS) e frontal (FS) (Monteiro *et al.*, 2000).

#### 4.1.2.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA ACTIVAÇÃO NA SUPERFÍCIE PLAQUETÁRIA: CD62 E RECEPTOR GPIIb/IIIa ACTIVADO

Durante a activação plaquetária, ocorrem diversas alterações na superfície de membrana, entre as quais, a fusão das membranas dos grânulos com a membrana plasmática, processo detectado com anticorpos específicos que reconhecem a glicoproteína da membrana dos grânulos, denominada de P-selectina (CD62P) (Immunotech, France). Por outro lado, ocorrem alterações conformacionais dos receptores de membrana, como o complexo GPIIb/IIIa, que só após activação plaquetária, expõe o local de união ao fibrinogénio. Este processo pode ser analisado através do anticorpo PAC-1 (Immunotech, France), que apenas se liga às plaquetas que se encontram num estado activado, permitindo detectar a conversão do complexo GPIIb/IIIa num receptor funcional do fibrinogénio.

Após tratamento com as diferentes concentrações de Eptifibatide (0-0,1 µg/mL), 12,5 µL das amostras de sangue diluído foram incubadas, no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 min., com 2,5 µL de CD62P-FITC e 2,5 µL de CD41-PE, enquanto outras foram incubados com 2,5 µL de PAC-1 FITC e 2,5 µL de CD61-PE (Immunotech, France), que detecta a glicoproteína GPIIIa, específica da membrana plaquetária. Nas amostras destinadas à análise da activação plaquetária, foram ainda adicionados 2,5 µL dos respectivos agonistas (trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5µM e TRAP 15 µM) e, GPRP (2,5 mM) nas amostras onde foi efectuada a estimulação com trombina. Posteriormente, as amostras foram diluídas com 500 µL de tampão *Tyrode* e analisadas no citómetro de fluxo, através dos protocolos correspondentes (Schimitz *et al.*, 1998).

#### 4.1.2.3. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO (ROS)

Para detectar a formação de ROS, antes e após o tratamento com Eptifibatide, foi utilizada a dihidrorodamina123 (DHR123) (Sigma Chemical CO., St. Louis MO), substrato fluorogénico que tem a capacidade de entrar na célula e após acção das espécies reactivas de oxigénio é oxidada a rodamina 123, fluorescente. Assim, a 50 µL de sangue total diluído foram adicionados 1 mL de Tampão *Tyrode* contendo 5 µL de DHR123, e incubaram durante 10 min., no escuro, a 37°C. Para verificar a geração de ROS, 500 µL da amostra marcada foram incubados com 5 µL de colagénio (10 µg/mL) (CHRONO-LOG Corporation, Havertown), durante 5 min. à temperatura ambiente (Fortuna M. *et al.*, 2005).

#### 4.1.2.4. DETERMINAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DA ACTINA

A polimerização da actina globular (G-actina) em actina filamentosa (F-actina) representa um dos acontecimentos mais precoces de activação plaquetária, directamente relacionados com alteração da forma das plaquetas, centralização dos grânulos e retracção do coágulo. Assim, a reorganização do citoesqueleto, após activação plaquetária, foi avaliada através da utilização da faloidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (faloidina-FITC) (Sigma Chemical CO., St. Louis MO). Esta sonda é responsável pela marcação selectiva da F-actina, não apresentando afinidade para a G-actina (Oda *et al.*, 1992; De la Cruz *et al.*, 1994). Após incubação das amostras de sangue total diluído com os diferentes agonistas (trombina 0,05 e 0,5 U/mL + GPRP (2,5 mM), ADP 5µM e TRAP 15 µM), durante 5 min., à temperatura ambiente, as amostras foram fixadas com o mesmo volume de paraformaldeído a 2 %. Após 30 min. de fixação à temperatura ambiente, as plaquetas foram separadas por centrifugação a 110g, durante 10 min.. Amostras de 200 µL da suspensão de plaquetas foram permeabilizados com 20 µL de Triton X-100 a 1 % e marcadas simultaneamente com faloidina-FITC (concentração final: 3,75 µM). Decorridos 60 min. de incubação, no escuro e à temperatura ambiente, as amostras foram diluídas com 500 µL de Tampão *Tyrode* e analisadas no citómetro de fluxo.

#### 4.2. Análise da Agregação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) por Agregometria Óptica

O efeito do Eptifibatide na agregação plaquetária, após estimulação com ADP, foi analisado no PRP, através do método turbidimétrico de Born (Born and Cross, 1962). Segundo esta metodologia, após a colheita de sangue total em citrato a 3,8 %, o PRP é obtido por centrifugação a 180 g, durante 15 min. e o número de plaquetas é ajustado a 200.000 plaquetas/µL, com plasma pobre em plaquetas (PPP). Após 30 min. em repouso, as amostras de PRP foram pré-tratadas com Eptifibatide (0-0,1 µg/mL), durante 15 min., à temperatura ambiente, e analisadas num agregómetro óptico (Bio-DATA 4-channel). Após calibração do agregómetro, determinou-se a linha basal durante 1min., adicionou-se o agonista (ADP a 10 µM) e registaram-se as alterações da transmissão de luz resultantes da agregação das plaquetas.



## 5. Análise do Perfil Proteico

### 5.1. Isolamento da Fracção Proteica Libertada pelas Plaquetas

Com o objectivo de se obterem amostras com elevado grau de pureza, sem contaminações com proteínas provenientes de outras células sanguíneas, nomeadamente dos eritrócitos e dos leucócitos, e de diminuir a activação artefactual das plaquetas inerente às próprias metodologias utilizadas no isolamento das mesmas, a fracção proteica libertada pelas plaquetas foi obtida de acordo com a metodologia previamente descrita por Piersma *et al.* (2009) com algumas modificações. Assim, imediatamente após a colheita, adicionou-se prostaglandina E1 (PGE1; Sigma Chemical CO., St. Louis MO) à amostra de sangue total, numa concentração final de 2  $\mu$ M, com o objectivo de prevenir a activação plaquetária artefactual. Após 10-15 min. de incubação, preparou-se o PRP a partir de 50 mL da amostra de sangue total, por centrifugação a 180 g, durante 10 min., à temperatura ambiente. O PRP obtido foi transferido para tubos cónicos e centrifugado a 720 g durante 10 min.. O sobrenadante (PPP – plasma pobre em plaquetas) foi rejeitado e procedeu-se à lavagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuscitado em tampão *Tyrode* e as plaquetas foram lavadas, duas vezes, por centrifugação a 720 g durante 10 min. Após a primeira lavagem foi novamente adicionado às amostras PGE1, na concentração final de 2  $\mu$ M. Após as lavagens, as plaquetas foram ressuscitadas em 1 mL de tampão *Tyrode* e permaneceram em repouso durante 30 min.. Para verificar o efeito do Eptifibatide no secretoma das plaquetas, amostras da suspensão plaquetária foram incubadas com 0,1  $\mu$ g/mL deste fármaco, durante 15 min. à temperatura ambiente. Posteriormente, amostras sem qualquer tratamento e outras previamente tratadas com o Eptifibatide foram activadas com trombina, numa concentração final de 0,5 U/mL (Sigma Chemical CO., St. Louis MO).

A fracção proteica libertada pelas plaquetas foi obtida através de duas centrifugações sequenciais, a 1000 g, durante 10 min. Contudo, após se ter verificado, pela análise do perfil proteico no gel SDS-PAGE e pela expressão dos marcadores PAC1-FITC e CD62- FITC por citometria de fluxo, que as amostras basais (sem activação com trombina) se encontravam activadas artefactualmente, pelo procedimento experimental adoptado, substituíram-se as duas centrifugações finais por uma filtração, com filtros de 0,2  $\mu$ m de diâmetro (Schleicher & Schuell, Germany). Após a filtração, o isolado proteico foi concentrado, em filtros da Amicon Ultra-4 (Millipore Corporation, USA), de 10 kDa *cut-off*, após centrifugação a 4000 g durante 15 min., e armazenado a -20 °C até se proceder à precipitação e quantificação da proteína total.

### 5.1.1. Monitorização por Citometria de Fluxo

De modo a monitorizar a activação artefactual das plaquetas ao longo de todo o procedimento técnico, utilizado para o isolamento da fracção proteica libertada pelas plaquetas, foram retirados ao longo do procedimento, alíquotas de 30  $\mu$ L das amostras de sangue total, das plaquetas lavadas e das plaquetas retidas no sedimento, após a primeira centrifugação realizada para o isolamento do secretoma das plaquetas. Nestas amostras analisaram-se, por citometria de fluxo, dois parâmetros de activação plaquetária: expressão de receptores do fibrinogénio activados (GPIIb/IIIa activada) e a expressão de P-selectina (CD62), na superfície plaquetária, usando a metodologia descrita previamente no ponto 4 deste capítulo.

## 5.2. Electroforese em Gel

### 5.2.1. Preparação das Amostras

Com o intuito de concentrar a proteína total nas fracções libertadas pelas plaquetas, e de eliminar sais, procedeu-se à precipitação da proteína com ácido tricloroacético (TCA) /acetona. Deste modo, adicionou-se um dado volume de uma solução de 50 % (m/v) TCA às amostras, de modo a obter uma concentração final de TCA de 20 % (m/v). Após 1 hora de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C, durante 30 min.. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* foi ressuscitado em acetona gelada e mantido durante aproximadamente 12 horas a -20 °C. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 14000 rpm, a 4 °C, durante 30 min., tendo-se, em seguida, rejeitado o sobrenadante e secado as amostras na SpeedVac® Plus SC 210 A (Thermo Savant, USA). Posteriormente, os *pellets* foram ressuscitados num tampão adequado ao tipo de electroforese a realizar. Assim, para a análise por SDS-PAGE, aos *pellets* foi adicionado tampão de redução (contendo 4 % de SDS, 0,5 M de Tris pH de 6,8, 15 % de glicerol, 20 % de mercaptoetanol e azul bromofenol) e as amostras foram fervidas de forma a garantir a desnaturação total das proteínas. Para a análise por electroforese bidimensional 2D-PAGE, os *pellets* resultantes da precipitação com TCA/acetona foram ressuscitados em tampão de rehidratação (8 M ureia, 2 M tiourea e 1 % CHAPS) sem 12,9 mM de DTT, 0,01 % de azul de bromofenol e 0,1 % de *pharmalyte* 3-10.

A concentração de proteína total presente nas diferentes fracções foi determinada utilizando o método colorimétrico *RC DC Protein Assay* (BioRad). Este método baseia-se numa modificação do protocolo de Lowry *et al.* (1951), permitindo a quantificação de

proteína na presença de agentes redutores e detergentes. Os valores de densidade óptica foram determinados a 750 nm num espectrofotómetro (Genesys 6, Thermo Electron Corporation, USA). Simultaneamente, foi efectuada uma curva de calibração utilizando-se para o efeito padrões de BSA com diferentes concentrações.

### **5.2.2. Electroforese SDS-PAGE**

Com o objectivo de separar as proteínas existentes na fracção proteica libertada pelas plaquetas, com ou sem tratamento com Eptifibatide, para posterior identificação por espectrometria de massa, procedeu-se à separação electroforética de 15 µg de proteína num gel SDS-PAGE de 12,5 % preparado de acordo com Laemmli (1970). Depois de desnaturadas, as amostras foram aplicadas no gel. No mesmo gel, para além das amostras de estudo, aplicaram-se como controlo, uma amostra não activada com trombina, bem como uma amostra de plasma pobre em plaquetas (PPP). As proteínas da amostra foram separadas a uma voltagem de 200 V durante 40 min.. Os géis obtidos foram corados com Azul de Coomassie coloidal.

### **5.2.3. Electroforese Bidimensional (2D- PAGE)**

As amostras activadas com trombina, sem tratamento ou pré-tratadas com Eptifibatide, foram, ainda, analisadas por 2D-PAGE de acordo com o procedimento previamente descrito por O'Farrel e Klose (1975). Assim, numa primeira dimensão, as proteínas das amostras foram separadas por focagem isoeléctrica (IEF), com base na sua carga nativa, e numa segunda dimensão, por SDS-PAGE, pelo seu peso molecular. Para o efeito solubilizaram-se 150 µg de amostra em tampão de rehidratação (8 M ureia, 2 M tiourea, 1 % CHAPS, 12,9 mM DTT, 0,1 % pharmalyte 3-10 NL e 0,01 % azul de bromofenol) num volume final de 250 µL. As amostras foram aplicadas num reservatório e colocou-se a tira de acrilamida (IPG strip 3-10 NL, GE Healthcare) de maneira a ficar em contacto com a amostra. Depois de se cobrir a tira com *Drystrip Cover Fluid*, o reservatório foi colocado no IPGPhor (GE Healthcare), tendo-se utilizado o seguinte programa: 12 h de rehidratação a 50 Mw, 1 h a 500 Volts, 1 h a 1000 Volts e 2 h a 8000 Volts). Uma vez terminada a focagem isoeléctrica, as tiras foram incubadas durante 15 min com tampão de equilíbrio (0,05 M Tris pH 8,8, 35,6 % (m/v) de ureia, 30% (m/v) de glicerol, 2% (m/v) de SDS). As tiras foram posteriormente lavadas com tampão de corrida (0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 1 % SDS, pH 8,6) e colocadas no topo de um gel SDS-PAGE 12,5 %. A separação com base no peso molecular foi realizada a 200 V, 75 mA e 15 W

durante aproximadamente 3 horas. A detecção das proteínas nos géis foi realizada com azul de Comassie Coloidal.

#### **5.2.4. Revelação dos Géis com Comassie Coloidal Blue (G250)**

Para a detecção das proteínas, os géis foram revelados com Azul de Comassie Coloidal (G-250). Neste sentido, uma vez terminada a separação electroforética das proteínas, procedeu-se à fixação colocando os géis numa solução de 40 % de metanol (v/v) e 10 % de ácido acético (v/v), em agitação, durante 1 hora. Seguidamente, os géis foram lavados 3 vezes com água destilada, durante 10 min. cada, e colocados na solução de Comassie Coloidal G250 (0,12 % (m/v) de G250 em 20 % (v/v) de metanol) durante 12 horas. Com a finalidade de eliminar a ligação inespecífica da solução corante, efectuaram-se várias lavagens com uma solução descorante de 25 % (v/v) de metanol. Por fim, os géis foram colocados em água destilada e digitalizados num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BioRad), para posterior análise, por QuantityOne versão 4.6.3 e PdQuest versão 8.0 (BioRad) dos géis SDS-PAGE e 2D-PAGE, respectivamente.

#### **5.3. Preparação das Amostras para Análise por Espectrometria de Massa**

Para a identificação das proteínas por espectrometria de massa, as bandas/spots extraídas dos géis SDS-PAGE e 2D-PAGE, respectivamente, foram lavadas duas vezes com 25 mM hidrogenocarbonato de amónio e 50 % (v/v) de acetonitrilo, seguida de uma lavagem com 100 % de acetonitrilo, com o objectivo de remover o corante e desidratar os pedaços de gel. Posteriormente, as bandas/spots foram secas sob vácuo na SpeedVac<sup>®</sup> Plus SC 210 A e efectuou-se a digestão proteica numa solução de 1 mg/mL de tripsina, (v511, Promega), durante 60 min., a 37°C. Decorrido o período de incubação, foi adicionado às amostras 25 mM hidrogenocarbonato de amónio, até todos os pedaços do gel se encontrarem submersos, voltando-se a incubar durante a noite a 37°C. A extracção dos péptidos dos géis fez-se recolhendo o sobrenadante de cada amostra para um novo eppendorf, seguindo-se uma lavagem com ácido fórmico 10 % e acetonitrilo ultra puro. Após repetição do procedimento anterior, todos os sobrenadantes adquiridos foram concentrados na SpeedVac<sup>®</sup> Plus. Os digestos foram ressuspensos em 50 % acetonitrilo/0,3 % de ácido trifluoroacético para serem então aplicados numa placa de MALDI (Vitorino *et al.*, 2004).

#### 5.4. Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)

Os espectros de massa dos péptidos, resultantes da digestão enzimática das proteínas, foram obtidos num espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de modo reflectrão positivo e obtidos no intervalo de massas de 700-4500 Da, com 1.000 tiros de laser. Foi criado um método de aquisição de espectros de MS/MS, excluindo os picos da matriz, devido à autólise da tripsina ou da acrilamida. O pico correspondente ao padrão interno Glu-Fib ( $m/z$  1570.68Da) foi utilizado como calibrador interno do aparelho. Os espectros foram processados e analisados pela *Global Protein Server (GPS) Workstation* (Applied Biosystems), que utiliza como motor de busca o Mascot (Matrix Science, London, UK) para a identificação de proteínas conjugando os dados de PFM (*peptide mass fingerprinting*) com os dados de MS/MS (*peptide fragment fingerprinting*) para pesquisa numa base de dados interna. A identificação da proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 95 % e um score de Mascot superior a 70.

#### 6. Análise Estatística dos Resultados

Uma vez que todas as variáveis analisadas apresentaram uma distribuição normal, os resultados deste estudo foram processados através de testes estatísticos paramétricos. A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis em estudo e as diferenças entre as mesmas foram analisadas com base na variância multifactorial *one-way* ANOVA seguida da aplicação do teste de *Dunnett's* e *Tukey post-hoc* de comparação múltipla. O cálculo dos dados foi efectuado através do *software* GraphPad Prism® versão 5.0. O nível de significância (*p-value*) estabelecido foi de 0,05.

---

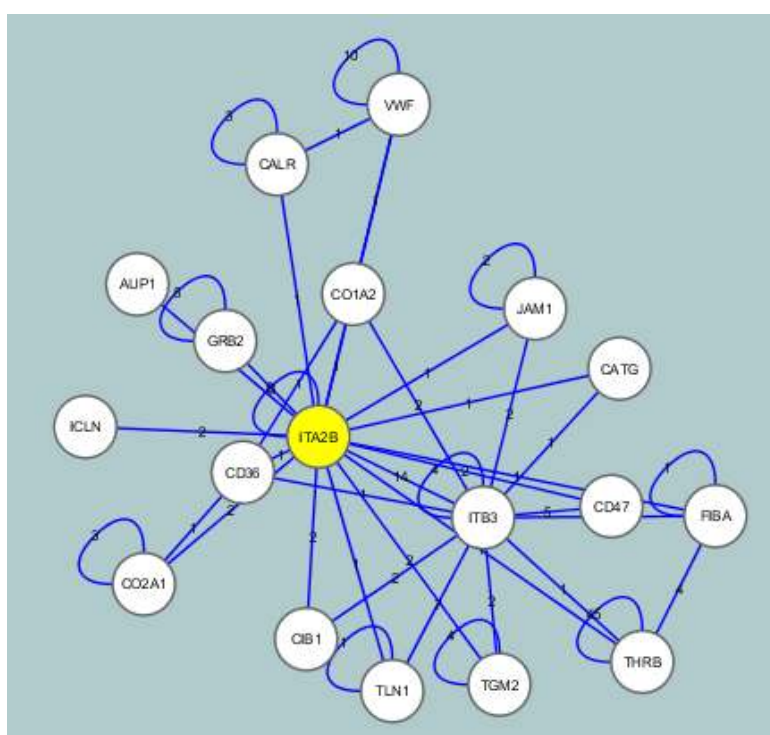
## **IV – Resultados**

---

## IV. RESULTADOS

### 1. Interações Estabelecidas pela GPIIb/IIIa

No sentido de compreender o efeito do Eptifibatide nas respostas de activação plaquetária e atendendo à interacção descrita na literatura (Ericce *et al.*, 1999; Michelson *et al.*, 2001) entre este fármaco e a GPIIb/IIIa, pesquisou-se com a ferramenta bioinformática *Plug-in Apid* do *Cytoskape* as interacções que já são conhecidas entre este receptor e outras proteínas, estando estas representadas na Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Esquema das potenciais interações descritas na literatura que podem ser estabelecidas pela GPIIb/IIIa (ITA2B) (*Plug-in Apid* do *Cytoskape*). (As abreviaturas apresentadas na figura têm correspondência na Tabela 4.1)

Fundamentalmente, a GPIIb/IIIa interage com proteínas citoplasmáticas que regulam as vias de sinalização responsáveis pelas respostas de activação plaquetária. Assim, interage directamente: (a) com proteínas de ligação ao cálcio, como a integrina 1 e a calreticulina que actuam como moléculas sinalizadoras, que regulam as respostas induzidas pela libertação de cálcio; e (b) com proteínas envolvidas directamente na regulação da hemostase primária como a CD36, receptor da trombospondina, cadeia *alpha* – 2 do

colagénio, vWF, molécula A de adesão juncional, PF4, protrombina, fibrinogénio e com o *methylosome subunit pICln* envolvido na manutenção do volume celular e do fluxo sanguíneo, através da regulação dos canais de cloro.

Para além das principais proteínas mencionadas, a GPIIb/IIIa pode ainda interagir com proteínas que regulam a mobilidade celular como a talina-1, processos de diferenciação celular, como a proteína 2 de ligação a factores de crescimento e a interacção com outras células, nomeadamente com os leucócitos, através do antígeno de superfície leucocitário, CD47 (Tabela 4.1).

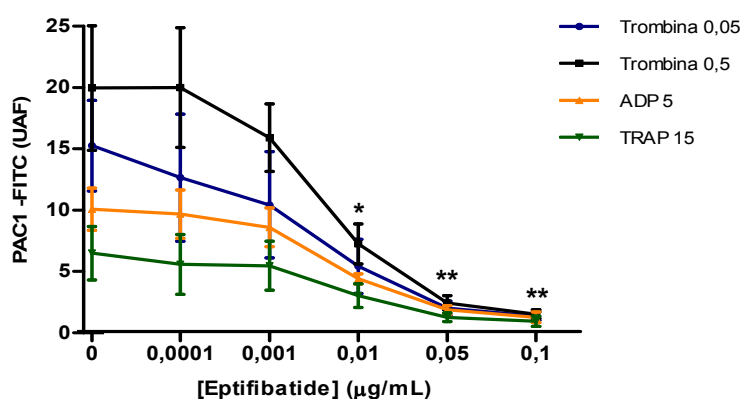
**Tabela 4.1.** Possíveis interacções estabelecidas pela GPIIb/IIIa (ITA2B), de acordo com o *Plug-in Apid* do *Cystoskape*.

ID	APID_ID	Descrição	UniProtKB	UNIPROT_NAME	Canonical Name
ITA2B	7530	Integrina <i>alpha</i> -IIb (GPIIb/IIIa)	P08514	ITA2B_HUMAN	ITA2B
TLN1	41394	Talina -1	Q9Y490	TLN1_HUMAN	TLN1
CIB1	21763	Proteína integrina 1 de ligação ao cálcio	Q99828	CIB1_HUMAN	CIB1
CO1A2	19671	Cadeia <i>alpha</i> – 2 (I) do colagénio	P08123	CO1A2_HUMAN	CO1A2
GRB2	80	Proteína 2 de ligação ao receptor do factor de crescimento	P62993	GRB2_HUMAN	GRB2
ICLN	30270	<i>Methylosome subunit pICln</i>	P54105	ICLN_HUMAN	ICLN
VWF	4800	Factor de <i>vonWillebrand</i>	P04275	VWF_HUMAN	VWF
CATG	42064	Catepsina G	P08311	CATG_HUMAN	CATG
CD47	25866	Antígeno de superfície leucocitário CD47	Q08722	CD47_HUMAN	CD47
CO2A1	48927	Cadeia <i>alpha</i> – 1 (II) do colagénio	P02458	CO2A1_HUMAN	CO2A1
TGM2	15249	Proteína glutamina <i>gamma</i> - glutamil transferase 2	P21980	TGM2_HUMAN	TGM2
CALR	11332	Calreticulina	P27797	CALR_HUMAN	CALR
THRB	7	Protrombina	P00734	THRB_HUMAN	THRB
FIBA	11350	Fibrinogénio, cadeia <i>alpha</i>	P02671	FIBA_HUMAN	FIBA
AUP1	43967	<i>Ancient ubiquitous protein 1</i>	Q9Y679	AUP1_HUMAN	AUP1
CD36	48929	Glicoproteína plaquetária 4	P16671	CD36_HUMAN	CD36
JAM1	39244	Molécula A de adesão juncional	Q9Y624	JAM1_HUMAN	JAM1
ITB3	2819	Integrina <i>beta</i> -3	P05106	ITB3_HUMAN	ITB3

Nas nossas condições experimentais, e por CMF, foi analisada a ligação do Eptifibatide à GPIIb/IIIa, utilizando um anticorpo monoclonal (PAC-1) que se liga especificamente a um epítipo expresso neste receptor, após alterações conformacionais



consequentes da activação plaquetária (Andrew *et al.*, 2001; Eli *et al.*, 2001). Efectivamente, por CMF verificou-se que o Eptifibatide, antagonista da GPIIb/IIIa, provocou uma diminuição acentuada na ligação de PAC-1, após a estimulação com trombina (0,05 e 0,5 U/mL), ADP (5  $\mu$ M) e TRAP (15  $\mu$ M), para concentrações  $\geq 0,01$   $\mu$ g/mL ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 4.2). Pela análise da curva de regressão para cada um dos agonistas utilizados, verificou-se que o IC<sub>50</sub> (concentração para a qual 50 % da população plaquetária se encontra inibida) se encontra no intervalo de 0,001 a 0,05  $\mu$ g/mL de Eptifibatide (trombina 0,05 U/mL: 0,009  $\mu$ g/mL; trombina 0,5 U/mL: 0,008  $\mu$ g/mL; ADP 5  $\mu$ M: 0,011  $\mu$ g/mL e TRAP 15  $\mu$ M: 0,029  $\mu$ g/mL).



**Figura 4.2.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu$ g/mL) na ligação de PAC-1, após a estimulação das plaquetas no sangue total com trombina (0,05 e 0,5 U/mL), ADP (5  $\mu$ M) e TRAP (15  $\mu$ M). UAF: unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total (eventos CD61+). Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão dos cinco dadores.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,0001$

Na análise deste marcador bioquímico, a variabilidade interindividual observada foi menor comparativamente a todos os outros marcadores analisados por CMF, devido à especificidade de ligação do Eptifibatide ao receptor do fibrinogénio activado, o mesmo local onde se liga o marcador utilizado, PAC-1.

O estudo deste marcador bioquímico de activação plaquetária, directamente relacionado com o mecanismo de actuação do Eptifibatide, permitiu ainda a selecção da concentração do fármaco e do agonista utilizada na análise da fracção proteica libertada pelas plaquetas após activação. Assim, optou-se pela utilização de 0,1  $\mu$ g/mL de Eptifibatide no estudo do perfil proteico, visto ser esta a concentração onde se verificaram as diferenças mais acentuadas sob o efeito deste antiplaquetário, e a estimulação com trombina 0,5 U/mL onde se observaram maiores amplitudes de resposta.

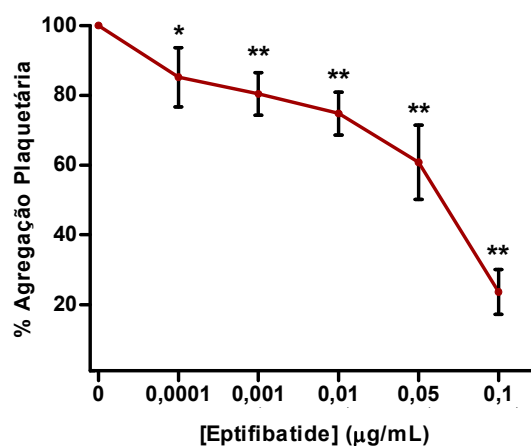
Posteriormente, e com o objectivo de avaliar o efeito do Eptifibatide nas respostas de activação plaquetária foram caracterizadas as alterações induzidas pelo Eptifibatide, no secretoma das plaquetas através de metodologias proteómicas, em complementaridade com a respectiva avaliação funcional, utilizando a CMF e agregometria óptica.

## 2. Análise Funcional

Para avaliar o efeito do antiplaquetário Eptifibatide na função plaquetária, determinou-se a agregação plaquetária em PRP, bem como vários parâmetros bioquímicos de activação plaquetária por CMF, tais como a mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a determinação da polimerização de actina e alterações morfológicas das plaquetas, a expressão na superfície plaquetária de P-selectina (CD62) e a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS).

### 2.1. Análise da Agregação do PRP por Agregometria Óptica

A agregação plaquetária foi avaliada em PRP pelo método de Born (1962) e, como expectável, o Eptifibatide produziu uma inibição acentuada da agregação plaquetária induzida pelo ADP (10  $\mu\text{M}$ ), como se pode verificar na Figura 4.3, estatisticamente significativa para concentrações  $\geq 0,0001 \mu\text{g/mL}$  ( $85,20 \pm 8,53$ ;  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 4.3.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) na agregação plaquetária induzida pelo ADP (10  $\mu\text{M}$ ). Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de cinco dados obtidos em experiências independentes. Foi obtido um  $\text{IC}_{50}$  de 0,062  $\mu\text{g/mL}$ .

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,0001$

Da análise da curva de regressão obteve-se um  $\text{IC}_{50}$  de 0,062  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2.2. Análise Multiparamétrica por Citometria de Fluxo

Para avaliar o efeito do Eptifibatide em vários parâmetros bioquímicos de activação plaquetária utilizaram-se diferentes agonistas plaquetários (trombina a 0,05 e 0,5 U/mL, ADP a 5  $\mu$ M e TRAP a 15  $\mu$ M), antes e após o tratamento do sangue total com diferentes concentrações do antiplaquetário em estudo. Foram usados vários agonistas plaquetários, pelo facto de activarem diferentes mecanismos de transdução de sinal (Capítulo II, ponto 2.2.), o que permite uma análise mais eficaz dos possíveis efeitos do Eptifibatide nas respostas de activação plaquetária. As alterações nos diferentes marcadores bioquímicos de activação foram posteriormente monitorizadas por CMF.

### 2.2.1. Determinação Cinética da Mobilização do Cálcio Intracelular

A determinação da mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular foi efectuada através de ensaios cinéticos, visto tratar-se de um evento precoce e rapidamente reversível, que só pode ser analisado com precisão quando monitorizado em modo cinético e em tempo real. Assim, após a selecção da população plaquetária (eventos CD41+), foram registadas as variações de fluorescência do marcador de cálcio Fluo-4, para as diferentes concentrações de Eptifibatide testadas (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu$ g/mL) nas respostas máximas de  $Ca^{2+}$  livre citosólico após estimulação das plaquetas do sangue total com os diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5  $\mu$ M e TRAP 15  $\mu$ M.

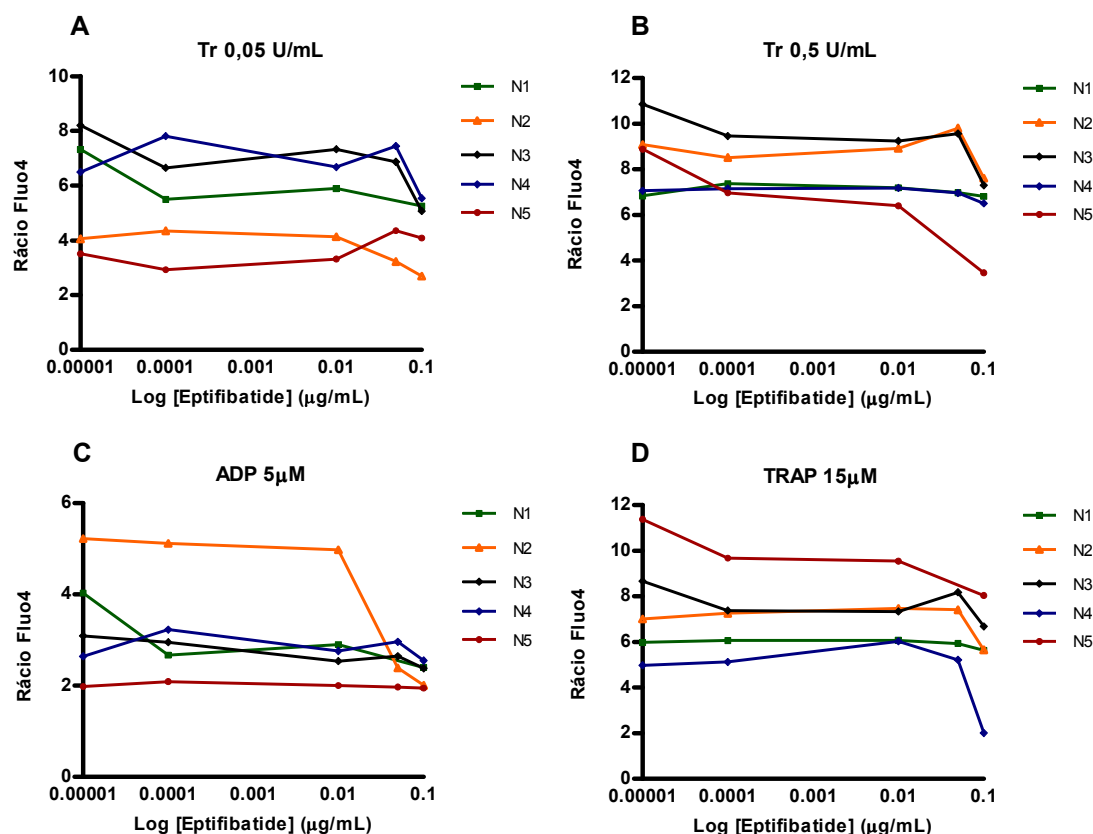
[Eptifibatide] ( $\mu$ g/mL)	Respostas Máximas de $Ca^{2+}$ (Rácio de fluorescência*)			
	Trombina (0,05 U/mL)	Trombina (0,5 U/mL)	ADP (5 $\mu$ M)	TRAP (15 $\mu$ M)
0	5,61 $\pm$ 1,89	8,54 $\pm$ 1,65	3,76 $\pm$ 1,99	7,60 $\pm$ 2,51
0,0001	5,50 $\pm$ 1,92	7,89 $\pm$ 1,07	3,40 $\pm$ 1,54	7,10 $\pm$ 1,71
0,01	5,25 $\pm$ 1,70	7,79 $\pm$ 1,23	2,39 $\pm$ 0,49	7,29 $\pm$ 1,43
0,05	5,48 $\pm$ 2,01	8,33 $\pm$ 1,57	2,28 $\pm$ 0,51	6,68 $\pm$ 1,34
0,1	4,79 $\pm$ 1,89	6,34 $\pm$ 1,67	2,28 $\pm$ 0,36	5,60 $\pm$ 2,24

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de cinco dados.

\*Rácio de fluorescência = intensidade média de fluorescência FL1 nas plaquetas activadas pelo agonista/média de FL1 nas plaquetas não estimuladas.

Como demonstrado na Tabela 4.2, o Eptifibatide inibiu ligeiramente as respostas de mobilização de  $Ca^{2+}$  induzidas pela trombina (0,05 e 0,5 U/mL), ADP (5  $\mu$ M) e TRAP (15

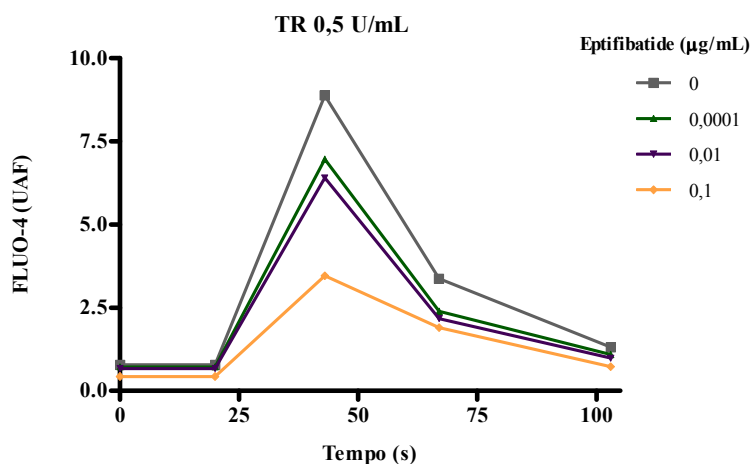
$\mu\text{M}$ ), para concentrações  $\geq 0.01 \mu\text{g/mL}$ . No entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, devido em grande parte à notória variabilidade interindividual das respostas de activação plaquetária, também observada em outros parâmetros (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Efeito do Eptifibatide nas respostas máximas de  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico, após estimulação das plaquetas no sangue total com (A) trombina 0,05 U/mL; (B) trombina 0,5 U/mL, (C) ADP 5  $\mu\text{M}$  e (D) TRAP 15  $\mu\text{M}$ . Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).

Assim, denota-se que para alguns dadores, como é o caso de N2, N4 e N5, o Eptifibatide inibe acentuadamente a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, induzida fundamentalmente pela trombina 0,5 U/mL, ADP 5  $\mu\text{M}$  e TRAP 15  $\mu\text{M}$ , em comparação com o efeito observado nos dadores N1 e N3 (Figura 4.4).

Na Figura 4.5 é apresentada uma cinética de cálcio citosólico livre, para o caso particular de N5, induzida pela trombina 0,5 U/mL, antes e após tratamento com Eptifibatide (0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 4.5.** Resultados da cinética de cálcio citosólico livre, após a estimulação com trombina a 0,5 U/mL, representativos de um dos cinco dadores (N5). UAF: unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária (eventos CD41+).

Da análise da figura é notório, que após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, aos 20 segundos o Eptifibatide inibiu acentuadamente, para este dador, a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, nomeadamente para concentrações de 0,1 µg/mL deste fármaco.

### 2.2.2. Determinação da Polimerização de Actina e Cinética das Alterações Morfológicas das Plaquetas

A polimerização da actina induzida pela estimulação das plaquetas com os diferentes agonistas testados em amostras de sangue total foi monitorizada por CMF, após a interrupção da reacção com paraformaldeído, e após a ligação da faloidina-FITC. Assim, o Eptifibatide apesar de não alterar a reorganização do citoesqueleto das plaquetas em condições basais, parece aumentar a expressão deste marcador após a estimulação com trombina (0,05 e 0,5 U/mL), ADP (5 µM) e TRAP (15 µM), para concentrações  $\geq 0,1$  µg/mL (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na ligação de Faloidina induzida por diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5 µM e TRAP 15 µM.

[Eptifibatide] (µg/mL)	Faloidina - FITC (UAF)				
	Basal	Trombina (0,05 U/mL)	Trombina (0,5 U/mL)	ADP (5 µM)	TRAP (15 µM)
0	52,42 ± 4,77	63,86 ± 6,73	73,70 ± 4,01	62,62 ± 8,92	59,66 ± 21,93
0,0001	53,82 ± 3,07	65,62 ± 6,87	71,63 ± 2,65	61,64 ± 5,55	58,66 ± 21,21
0,001	51,34 ± 7,38	63,28 ± 4,61	71,05 ± 7,36	63,04 ± 3,73	64,26 ± 27,45
0,01	52,58 ± 2,57	62,68 ± 4,24	73,68 ± 9,16	62,24 ± 9,29	59,64 ± 19,77
0,05	51,36 ± 3,43	65,52 ± 6,14	62,48 ± 15,10	63,46 ± 4,83	61,60 ± 17,64
0,1	57,36 ± 5,02	77,14 ± 12,90 *	77,25 ± 4,78	67,58 ± 1,68	61,26 ± 23,34

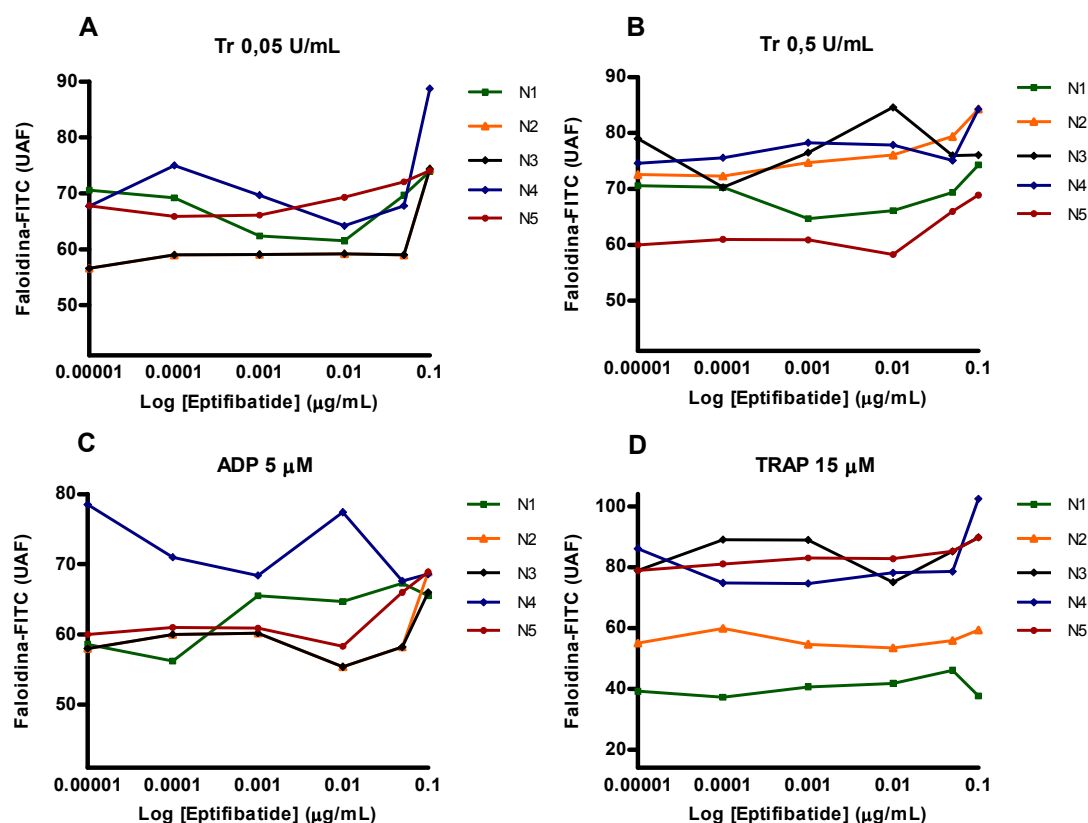
\* $p \leq 0,05$

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de cinco dadores.

UAF: unidades arbitrárias de fluorescência.

Como se pode constatar da análise da tabela 4.3, observaram-se diferenças estatisticamente significativas apenas quando se utilizou como agonista a trombina 0,05 U/mL, onde a fluorescência devida à ligação da faloidina-FITC aumentou de  $63,86 \pm 6,73$  (plaquetas não tratadas com Eptifibatide) para  $77,14 \pm 12,90$  (plaquetas pré-tratadas com 0,1 µg/mL de Eptifibatide) ( $p \leq 0,05$ ). Estes resultados sugerem, à semelhança do observado em outros parâmetros bioquímicos, que doses mais baixas de trombina, permitem detectar com maior sensibilidade, as alterações funcionais das plaquetas, provocadas pelo Eptifibatide.

Contudo, através da Figura 4.6 pode-se constatar que o aumento da polimerização da actina provocado pelo Eptifibatide é notório fundamentalmente nos dadores N3 e N4 para todos os agonistas utilizados à excepção do ADP 5 µM, onde esse efeito se encontra mais evidenciado no caso de N1, N2, e N5.



**Figura 4.6.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na ligação de faloidina após a estimulação das plaquetas com **(A)** trombina 0,05 U/mL; **(B)** trombina 0,5 U/mL, **(C)** ADP 5 µM e **(D)** TRAP 15 µM. UAF: unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total. Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).

Em simultâneo à análise da cinética de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, foram quantificadas por CMF as alterações nas propriedades de dispersão de luz da população plaquetária. Foi analisada ao longo do tempo, em resposta aos diferentes agonistas, a dispersão lateral de luz (SS) que indica a complexidade celular, dependente do tamanho, granularidade e morfologia de superfície, e que reflecte as alterações morfológicas consequentes à activação das plaquetas. Assim, apesar da diminuição de SS, observada após a adição dos diferentes agonistas, estar relacionada com a desgranulação das plaquetas após a sua activação, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas associadas às diferentes concentrações de Eptifibatide testadas (Tabelas 4.4).

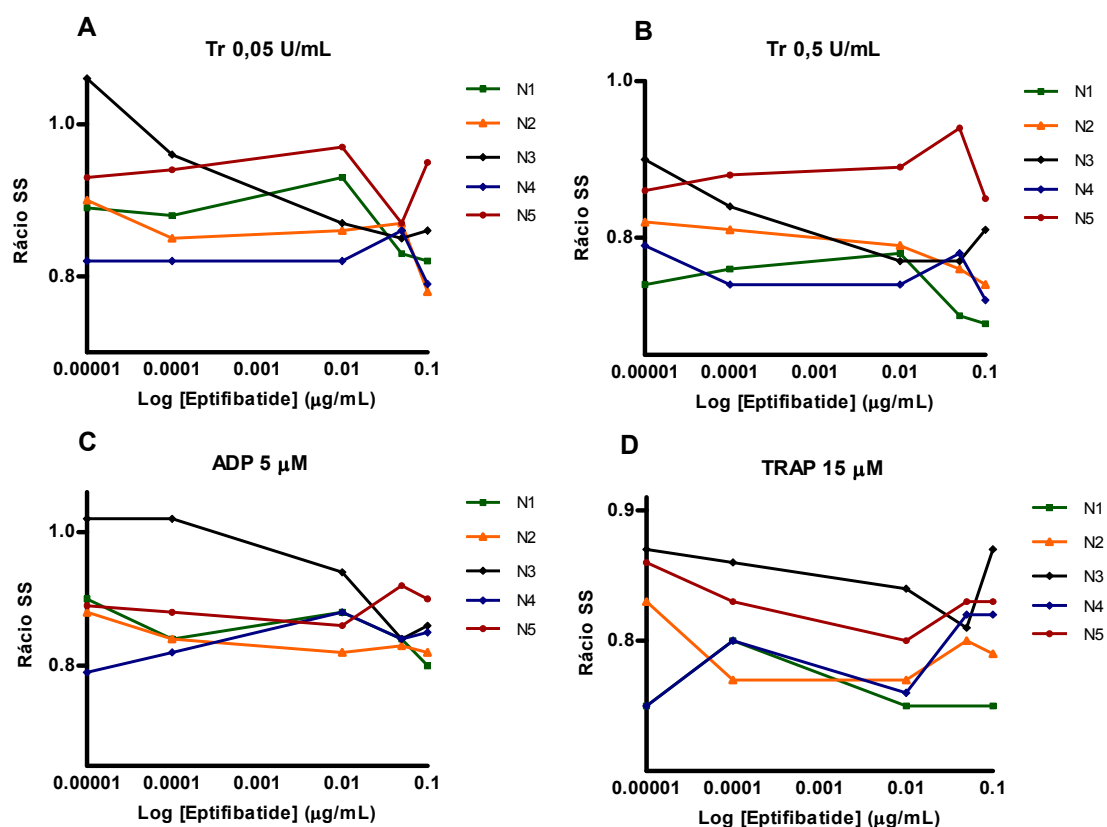
**Tabela 4.4.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) nas respostas máximas das alterações morfológicas (SS) após estimulação das plaquetas do sangue total com os diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5  $\mu\text{M}$  e TRAP 15  $\mu\text{M}$ .

[Eptifibatide] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Respostas Máximas de SS (Rácio de SS*)			
	Trombina (0,05 U/mL)	Trombina (0,5 U/mL)	ADP (5 $\mu\text{M}$ )	TRAP (15 $\mu\text{M}$ )
0	0,90 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,05
0,0001	0,87 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,03
0,01	0,89 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,04
0,05	0,92 $\pm$ 0,10	0,81 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,01
0,1	0,84 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,05

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de cinco dadores.

\*Rácio de SS = média do sinal de SS das plaquetas activadas pelo agonista/média do sinal de SS das plaquetas não estimuladas.

Contudo, em condições basais e após a estimulação com trombina 0,05; 0,5 U/mL e ADP 5  $\mu\text{M}$ , o Eptifibatide parece inibir ligeiramente as respostas máximas de SS, para concentrações  $\geq$  0,05  $\mu\text{g/mL}$ , visíveis particularmente em três dos dadores analisados (N1, N2 e N3) (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Efeito do Eptifibatide nas respostas máximas de SS, após a estimulação das plaquetas no sangue total com (A) trombina 0,05 U/mL; (B) trombina 0,5 U/mL, (C) ADP 5  $\mu\text{M}$  e (D) TRAP 15  $\mu\text{M}$ . Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).



Porém, dos três dadores analisados, é particularmente evidente o efeito do Eptifibatide nas respostas máximas de SS, em N3, enquanto para N1 e N2 esse efeito depende do agonista e da dose de fármaco utilizada.

### 2.2.3. Determinação da Expressão de CD62 na Superfície Plaquetária

Para avaliar o processo de desgranulação plaquetária determinou-se a expressão de P-selectina (CD62) na superfície plaquetária. Esta proteína intracelular da membrana dos grânulos  $\alpha$  só se expressa à superfície das plaquetas quando ocorre fusão das membranas dos grânulos com a membrana plasmática. Contudo, e de acordo com estudos anteriores (Holmes *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2000), apesar da inibição verificada no receptor do fibrinogénio activado (Figura 4.2) e da tendência para inibir a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, na expressão de CD62, parâmetro directamente relacionado com o evento de desgranulação, para as concentrações de Eptifibatide testadas (Tabela 4.5 e Figura 4.8).

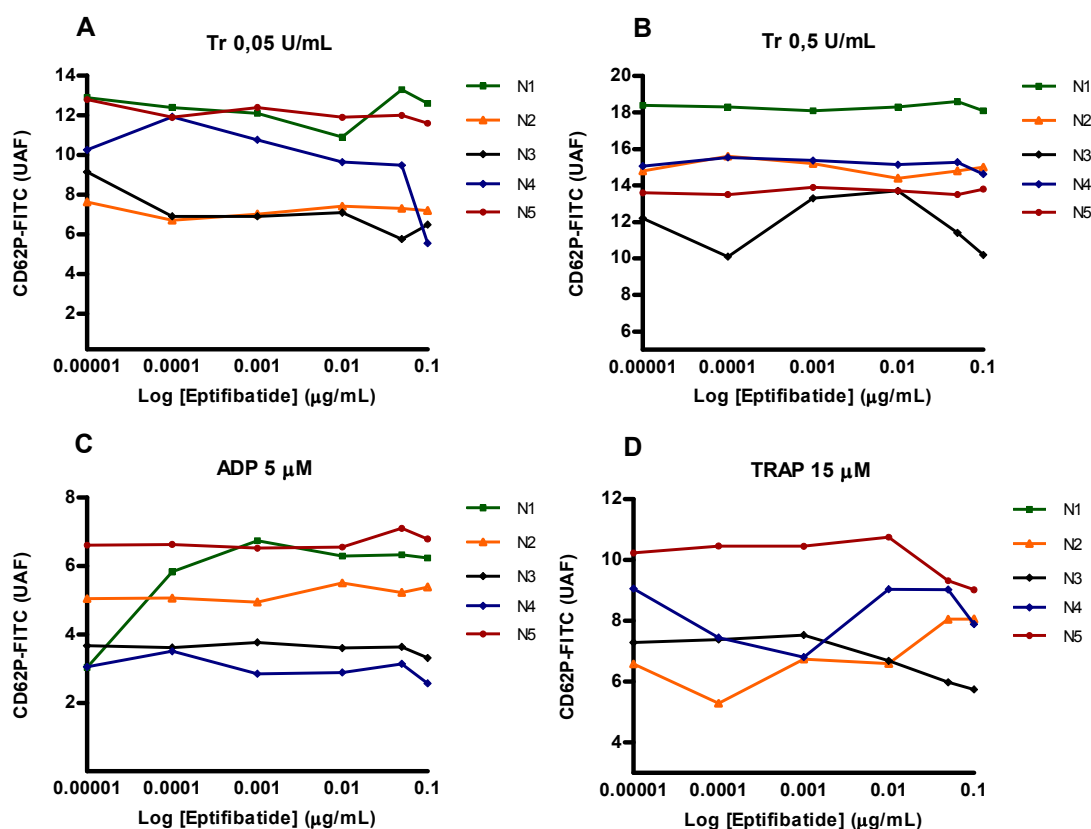
**Tabela 4.5.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na expressão de CD62P induzida por diferentes agonistas, trombina 0,05 e 0,5 U/mL, ADP 5  $\mu\text{M}$  e TRAP 15  $\mu\text{M}$ .

[Eptifibatide] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CD62P-FITC (UAF*)				
	Basal	Trombina (0,05 U/mL)	Trombina (0,5 U/mL)	ADP (5 $\mu\text{M}$ )	TRAP (15 $\mu\text{M}$ )
0	1,35 $\pm$ 0,25	9,52 $\pm$ 3,71	14,81 $\pm$ 2,30	4,61 $\pm$ 2,21	10,16 $\pm$ 3,85
0,0001	1,38 $\pm$ 0,26	9,55 $\pm$ 3,61	14,61 $\pm$ 3,04	5,24 $\pm$ 1,91	9,40 $\pm$ 3,92
0,001	1,33 $\pm$ 0,21	9,30 $\pm$ 3,54	15,17 $\pm$ 1,85	5,30 $\pm$ 2,17	9,58 $\pm$ 3,63
0,01	1,42 $\pm$ 0,40	8,78 $\pm$ 3,05	15,05 $\pm$ 1,91	5,38 $\pm$ 2,28	9,62 $\pm$ 3,30
0,05	1,36 $\pm$ 0,23	8,94 $\pm$ 3,73	14,72 $\pm$ 2,64	5,42 $\pm$ 2,25	9,85 $\pm$ 3,69
0,1	1,43 $\pm$ 0,25	8,64 $\pm$ 3,72	14,23 $\pm$ 2,81	5,19 $\pm$ 2,36	9,69 $\pm$ 3,44

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de cinco dadores.

\*UAF: unidades arbitrárias de fluorescência.

Estes resultados sugerem que as alterações que envolvem o processo de secreção se devem aos mecanismos de transporte do conteúdo dos grânulos, efectuado através do Golgi e não exclusivamente ao processo de exocitose e fusão membranar.



**Figura 4.8.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1 µg/mL) na expressão de CD62P, após a estimulação das plaquetas no sangue total com **(A)** trombina 0,05 U/mL; **(B)** trombina 0,5 U/mL, **(C)** ADP 5 µM e **(D)** TRAP 15 µM. UAF: unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total (eventos CD41+). Resultados obtidos nos cinco doadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).

Apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas na expressão de CD62, para as concentrações de Eptifibatide testadas, quando se utilizou como agonista plaquetário a trombina 0,05 U/mL é perceptível que para os doadores N3 e N4 o Eptifibatide parece inibir ligeiramente a expressão deste marcador (Figura 4.8).

#### 2.2.4. Detecção de Espécies Reactivas de Oxigênio (ROS)

A detecção de ROS foi monitorizada pela oxidação de DHR123 após a estimulação plaquetária com colagénio (10 µg/mL). Apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de Eptifibatide testadas, verifica-se uma tendência para o aumento na geração de ROS, visível na Figura 4.9. Em condições basais o Eptifibatide não altera a variação de fluorescência de DHR123 (Tabela 4.6).

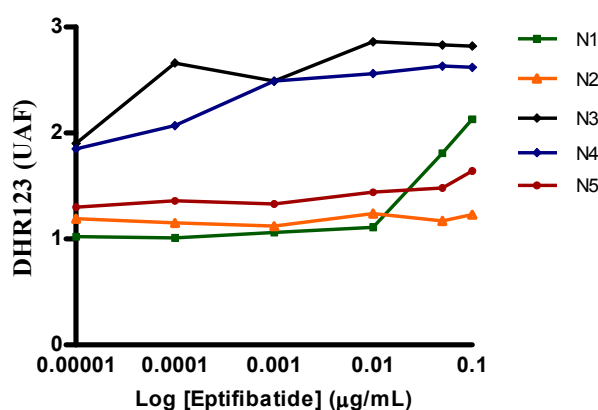
**Tabela 4.6.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) nas variações de fluorescência de DHR123 induzidas pelo colagénio (10  $\mu\text{g/mL}$ ).

[Eptifibatide] ( $\mu\text{g/mL}$ )	DHR123 (UAF*)	
	Basal	Colagénio (10 $\mu\text{g/mL}$ )
0	0,59 $\pm$ 0,06	1,42 $\pm$ 0,40
0,0001	0,58 $\pm$ 0,02	1,65 $\pm$ 0,70
0,001	0,58 $\pm$ 0,04	1,70 $\pm$ 0,73
0,01	0,59 $\pm$ 0,04	1,84 $\pm$ 0,81
0,05	0,60 $\pm$ 0,04	1,98 $\pm$ 0,72
0,1	0,61 $\pm$ 0,031	2,08 $\pm$ 0,66

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de cinco dadores.

\*UAF: unidades arbitrárias de fluorescência.

Para avaliar este parâmetro bioquímico de activação plaquetária, foi utilizado o colagénio, uma vez que é o agonista plaquetário que induz a geração de ROS em maior quantidade, detectável pelo método experimental utilizado.



**Figura 4.9.** Efeito do Eptifibatide (0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) na geração de ROS após a estimulação das plaquetas com colagénio (10  $\mu\text{g/mL}$ ). UAF: unidades arbitrárias de fluorescência na população plaquetária total (eventos CD41+). Resultados obtidos nos cinco dadores em estudo (N1, N2, N3, N4 e N5).

Da análise da Figura 4.9 é perceptível que o aumento na expressão de ROS é principalmente acentuado nos dadores N1, N3 e N4, quando comparado com N2 e N5, onde a expressão de DHR123 praticamente não é alterada para as concentrações de Eptifibatide testadas.

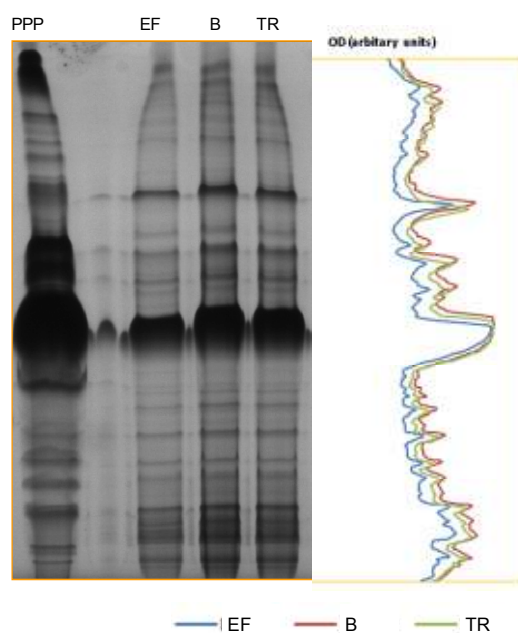
De um modo geral, a análise funcional efectuada pela avaliação dos diferentes parâmetros bioquímicos de activação plaquetária evidenciou que, para além de inibir a expressão do receptor do fibrinogénio activado GPIIb/IIIa, o Eptifibatide afecta morfológicamente as plaquetas, através de um aumento na polimerização de actina, e tem tendência a inibir ligeiramente a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Adicionalmente, o Eptifibatide parece não influenciar a expressão de CD62, embora a expressão deste marcador esteja directamente relacionada com a desgranulação. Por outro lado, este antiagregante parece ainda aumentar a produção de ROS, após activação plaquetária com colagénio.

### 3. Caracterização do Perfil Proteico do Secretoma das Plaquetas

Com o objectivo de analisar o efeito do Eptifibatide no perfil da fracção proteica libertada pelas plaquetas activadas, de modo a elucidar qual a influência deste fármaco nos mecanismos de secreção, recorreu-se a várias abordagens metodológicas baseadas na separação das proteínas do secretoma por electroforese mono- e bidimensional e na identificação das proteínas por espectrometria de massa *tandem*.

#### 3.1 Análise do Perfil Proteico da Fracção Libertada pelas Plaquetas por SDS-PAGE

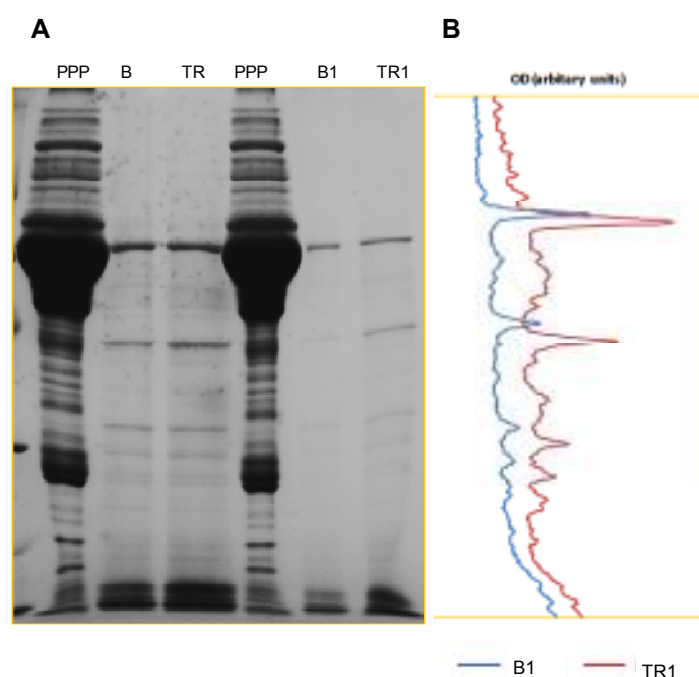
Por ser uma metodologia simples e rapidamente executável, numa primeira fase utilizou-se SDS-PAGE para obter uma perspectiva global das diferenças existentes entre o perfil proteico do secretoma das amostras basais (sem a estimulação com agonista plaquetário), das amostras estimuladas com trombina a 0,5 U/mL e das amostras pré-tratadas com Eptifibatide a 0,1  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4.10). Utilizou-se como agonista plaquetário, a trombina a 0,5 U/mL, uma vez que após a análise da expressão de P-selectina por CMF (Figura 4.8) e de acordo com estudos anteriores (Maguire *et al.*, 2002; Coppinger *et al.*, 2007), é a esta concentração que ocorrem as respostas máximas de desgranulação plaquetária.



**Figura 4.10.** Análise por SDS-PAGE do secretoma das plaquetas antes e após activação com trombina 0,5 U/mL, e com ou sem pré-tratamento com Eptifibatide (0,1 µg/mL). Do lado direito da imagem do gel de SDS-PAGE é apresentada uma análise comparativa do perfil de OD de cada amostra analisada. (OD: densidade óptica (em unidades arbitrárias); PPP: plasma pobre em plaquetas; EF: amostra activada com trombina 0,5 U/mL após tratamento com Eptifibatide; B: amostra basal e TR: amostra activada com trombina 0,5 U/mL).

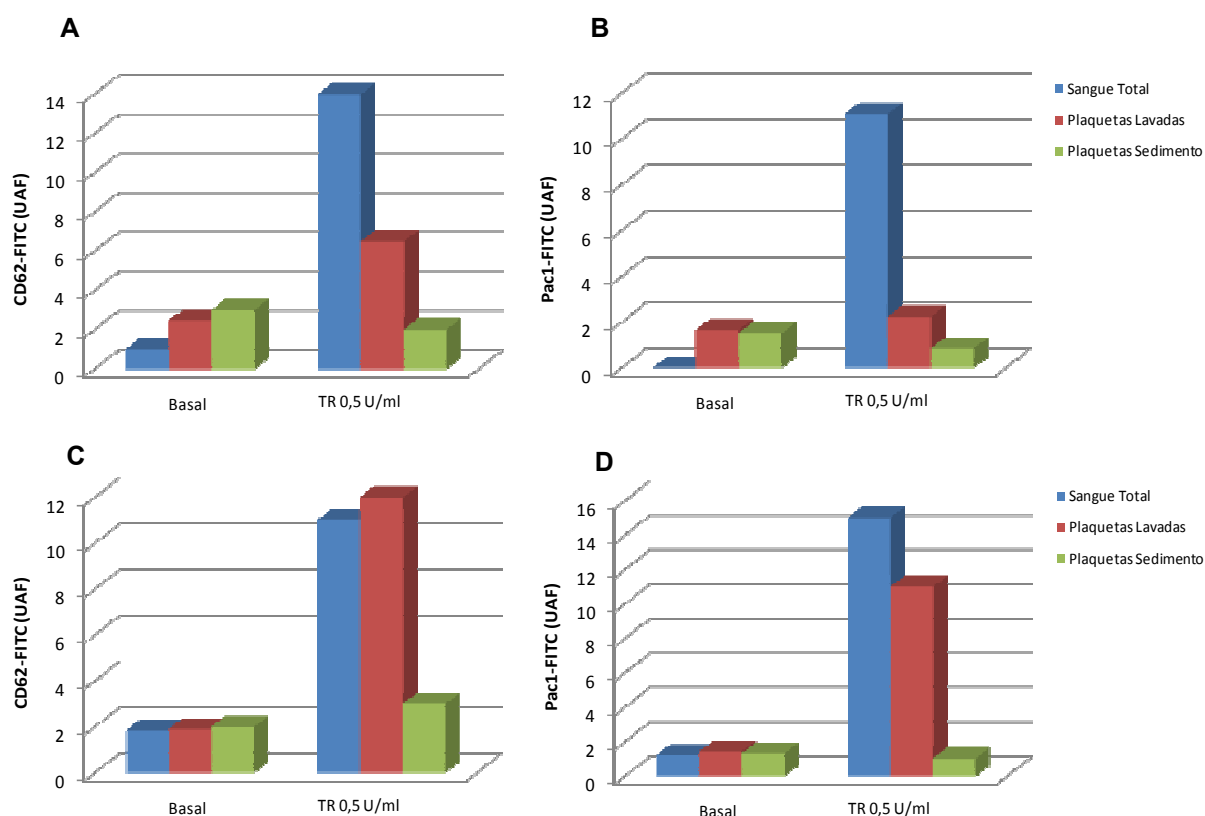
Da análise da Figura 4.10 é possível verificar que a amostra basal (não estimulada com agonistas plaquetários) se encontra igualmente activada quando comparada, através dos perfis de densidade óptica (OD), com a amostra estimulada com trombina 0,5 U/mL. Estes resultados sugerem que, apesar da utilização de PGE1 durante o isolamento do secretoma das plaquetas, mais concretamente antes da lavagem das plaquetas e da estimulação com trombina, ocorreu activação artefactual da população plaquetária, o que compromete a análise do efeito do Eptifibatide no secretoma com a abordagem metodológica adoptada neste estudo, baseada no protocolo descrito por Piersma *et al.* (2009). Nesse sentido, procedeu-se a algumas alterações ao procedimento descrito por estes autores, nomeadamente, substituiu-se as centrifugações finais por uma filtração, com filtros de 0,2 µm. Com a alteração introduzida ao procedimento original, foi possível observar na amostra basal, fundamentalmente a presença de uma banda com aproximadamente 67 kDa, correspondente à albumina, presente em grande quantidade nas amostras de PPP. Ao contrário, nas amostras estimuladas com trombina a 0,5 U/mL, observaram-se diferenças acentuadas nos perfis de densidade óptica das bandas do gel, comparativamente com a amostra basal (Figura 4.11), para o mesmo número de plaquetas analisadas. É ainda de realçar que quando a aplicação das amostras no gel é efectuada de acordo com o mesmo

número de proteínas, como verificado na Figura 4.11 (A), não são observadas diferenças significativas no perfil proteico entre as amostras basais e as amostras activadas com trombina a 0,5 U/mL, o que sugere que o efeito deste agonista é mais notório em termos quantitativos do que qualitativos.



**Figura 4.11. (A)** Análise por SDS-PAGE do secretoma das plaquetas antes e após activação com trombina 0,5 U/mL, normalizada à quantidade de proteína secretada pelas plaquetas (B vs TR) e ao número de plaquetas (B1 vs TR1). **(B)** Análise comparativa do perfil de OD do gel SDS-PAGE, entre as amostras B1 e TR1. (PPP: plasma pobre em plaquetas; B e B1: amostras basais; TR e TR1: amostras activada com trombina 0,5 U/mL; OD: densidade óptica expressa em unidades arbitrárias)

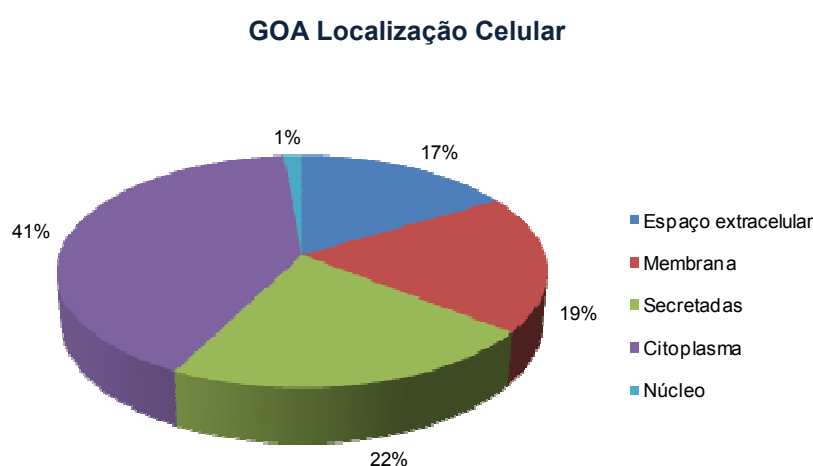
Paralelamente e para monitorizar a activação artefactual das plaquetas, ao longo da optimização efectuada ao procedimento experimental para isolamento da fracção proteica libertada pelas plaquetas, foram ainda analisados por CMF a expressão da GPIIb/IIIa activada e a expressão de P-selectina (CD62) na superfície plaquetária, em amostras de sangue total, plaquetas lavadas e plaquetas retidas no sedimento, após a primeira centrifugação realizada no isolamento do secretoma (Figura 4.12).



**Figura 4.12.** Expressão de CD62-FITC e ligação de PAC1-FITC em amostras de sangue total, plaquetas lavadas e plaquetas retidas no sedimento, antes e após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, segundo o protocolo descrito por Piersma *et al.* (2009) (**A e B**) e de acordo com o protocolo otimizado no presente estudo (**C e D**).

À semelhança da análise efectuada aos géis SDS-PAGE, é perceptível que nas amostras basais, onde não foi utilizado qualquer agonista, as plaquetas lavadas e as plaquetas presentes no sedimento encontram-se muito mais activadas do que as amostras de sangue total, para ambos os marcadores utilizados. Devido a esta activação artefactual, após a estimulação com trombina a 0,5 U/mL as respostas plaquetárias são menores nas plaquetas lavadas e nas plaquetas retidas no sedimento, em comparação com as amostras de sangue total. A utilização de PGE1 na primeira lavagem efectuada às plaquetas e um período de repouso de 30 min., no final das lavagens e antes da estimulação com trombina, demonstraram reduzir significativamente a activação artefactual das plaquetas lavadas e existentes no sedimento, melhorando substancialmente as respostas induzidas pela trombina nas plaquetas lavadas. O resultado da utilização dos filtros em substituição às centrifugações utilizadas foi apenas detectável pela análise dos géis SDS-PAGE e não por CMF, visto que as plaquetas ficam retidas nos filtros utilizados (Figura 4.12).

Posteriormente, as bandas dos géis SDS-PAGE corados com Comassie Coloidal, correspondentes às proteínas libertadas pelas plaquetas, após estimulação com trombina 0,5 U/mL, foram digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Com esta metodologia foi possível identificar um total de 32 proteínas diferentes (para um *protein score*  $\geq 95\%$ ; Tabela 8.1), posteriormente agrupadas com base no *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA), relativamente à localização celular e ao processo biológico, com base no PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*), relativamente ao processo biológico e com base em estudos anteriores (Coppinger *et al.*, 2004 e 2009; Piersma *et al.*, 2009). No que concerne à localização celular, as proteínas identificadas foram distribuídas em 5 grupos, que incluem: espaço extracelular, membrana, secretadas, citoplasma e núcleo (Figura 4.13). Com base na função, as proteínas foram agrupadas em 10 classes que incluem: metabolismo; transporte; diferenciação celular; regulação de processos biológicos; processos celulares; secreção; resposta a estímulos; mobilidade celular; biossíntese e morte celular.



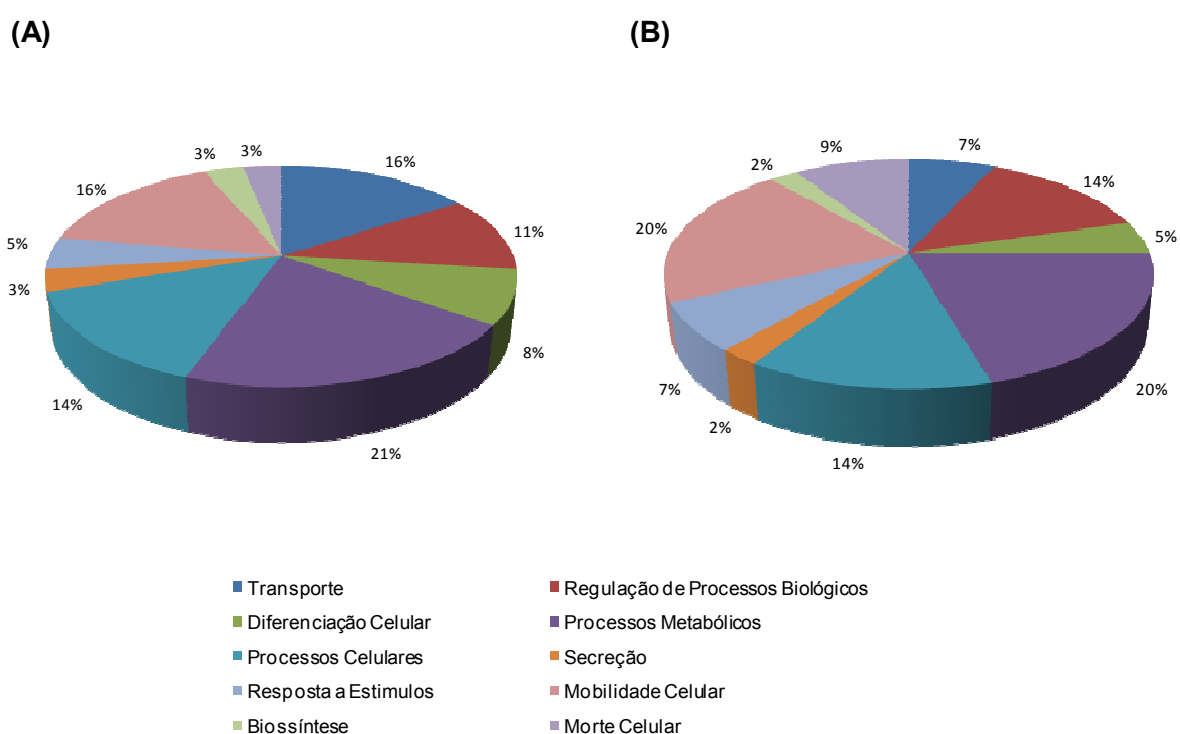
**Figura 4.13.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por SDS-PAGE-MS/MS, tendo por base o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA), relativamente à localização celular.

Relativamente à localização celular a maioria das proteínas identificadas encontram-se associadas ao citoplasma (41 %), seguida das proteínas secretadas (22 %) e localizadas na membrana (19 %) e no espaço extracelular (17 %) (Figura 4.13). Estes resultados são expectáveis tendo em consideração que as plaquetas libertam muitas proteínas que se encontram naturalmente no citoplasma e que só aparecem na fracção secretada após activação plaquetária (Piersma *et al.*, 2009). Curiosamente, de acordo com a UniProtKB-



GOA, foi identificada 1 proteína (1 %), a proteína 6 de ligação ao retinoblastoma, que se encontra apenas no núcleo celular (Figura 4.13).

Segundo a UniProtKB-GOA, de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas, a maioria das proteínas libertadas pelas plaquetas participam na mobilidade celular (20 %) e em múltiplos processos metabólicos (20 %), relacionados com a hemostase e a inflamação. De igual modo, encontram-se associadas à regulação de processos biológicos e celulares (14 %), morte celular (9 %), transporte e resposta a estímulos (7 %). Em menor quantidade foram ainda identificadas proteínas que regulam os processos de secreção (2 %), biossíntese (2 %) e diferenciação celular (5 %). A análise efectuada em simultâneo através do PANTHER não alterou significativamente esta distribuição funcional das proteínas identificadas (Figura 4.14).



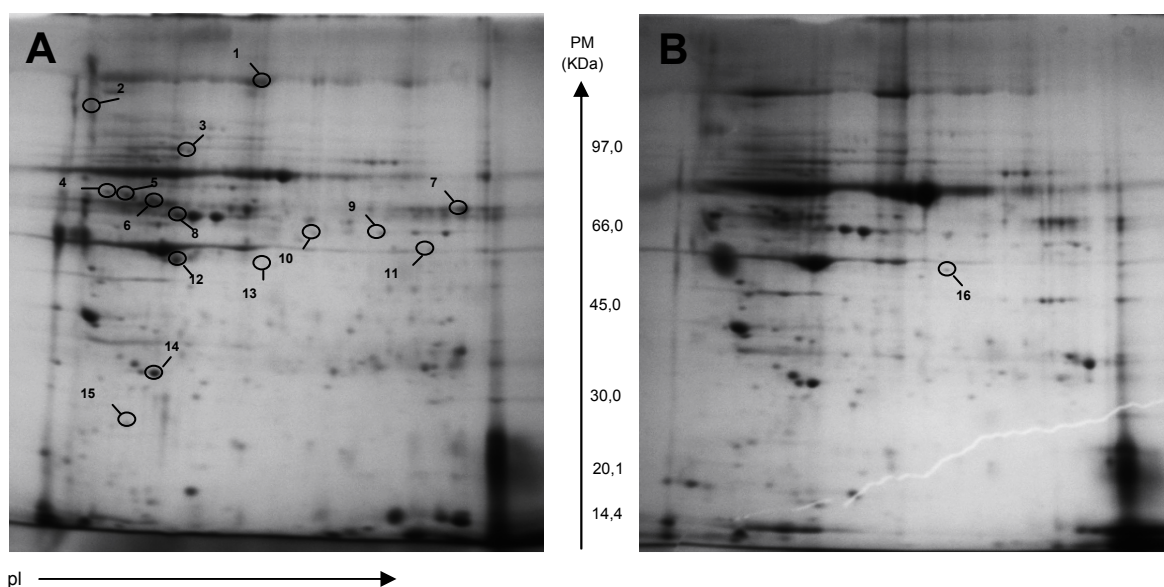
**Figura 4.14.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por SDS-PAGE-MS/MS, agrupadas relativamente ao processo biológico tendo por base **(A)** o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA) e tendo por base o **(B)** PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*).

Contudo, é de realçar que o maior número de proteínas envolvidas no transporte (16 %) e o menor número de proteínas envolvidas nos processos de morte e na mobilidade

celular (3 % e 16 %, respectivamente) de acordo com a análise efectuada com o software PANTHER (Figura 4.14).

### 3.2. Análise do Perfil Proteico da Fracção Libertada pelas Plaquetas por 2D-PAGE

Para uma melhor compreensão do efeito do Eptifibatide no secretoma das plaquetas, antes e após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, procedeu-se à realização de electroforese bidimensional (2D-PAGE), uma técnica mais sensível do que o SDS-PAGE. O perfil proteico da fracção libertada pelas plaquetas estimuladas com trombina 0,5 U/mL e pré-tratadas com Eptifibatide encontra-se representado na Figura 4.15.

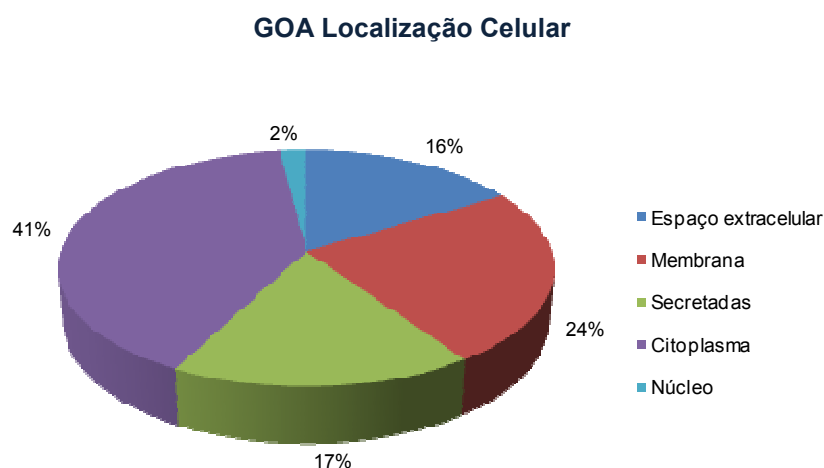


**Figura 4.15.** Análise por 2D-PAGE da fracção de proteínas libertadas pelas plaquetas estimuladas com trombina 0,5 U/mL, antes **(A)** e após **(B)** pré-tratamento com Eptifibatide 0,1 µg/mL. As proteínas assinaladas na imagem têm correspondência com a numeração apresentada na Tabela 4.7.

Da análise de um total de 451 *spots* removidos dos géis 2D-PAGE, foram identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF 73 proteínas diferentes, num total de 157 *spots*, mais 41 proteínas do que as identificadas por SDS-PAGE (Tabela 8.1).

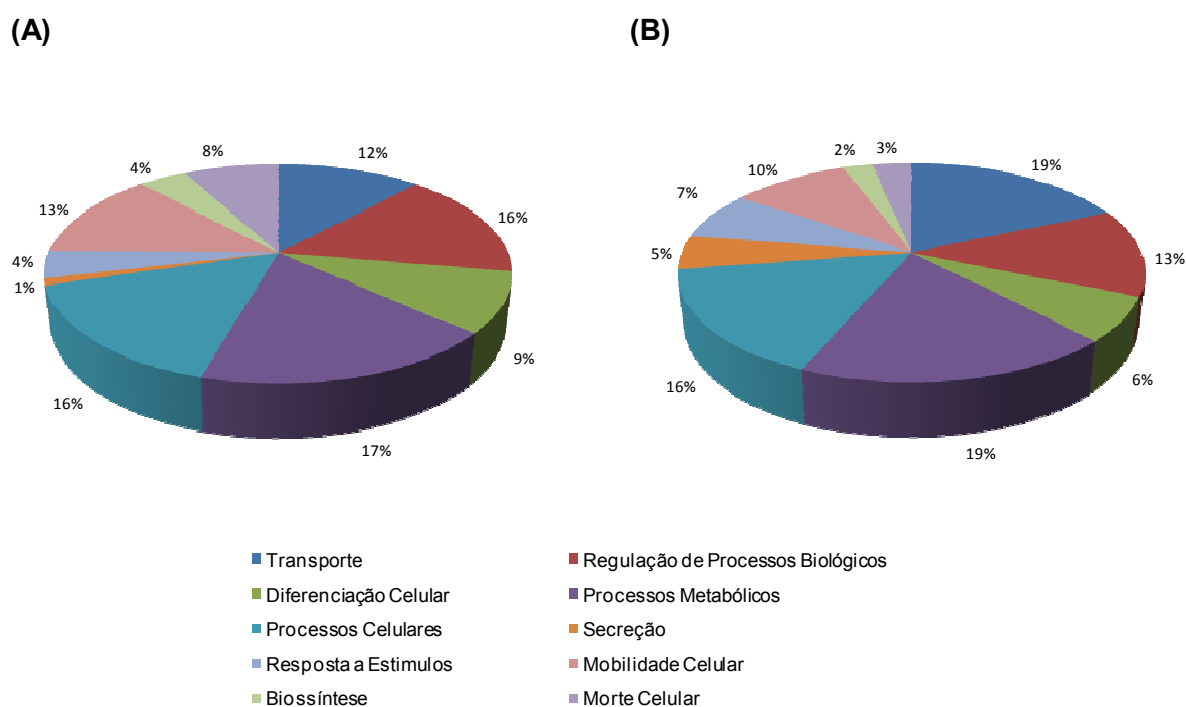
A análise, com os *softwares* UniProtKB-GOA e PANTHER, evidenciou a prevalência de proteínas com localização citoplasmática (42 %) (Figura 4.16), como verificado anteriormente (Figura 4.13). A esta fracção sucedem-se as proteínas membranares (25 %), secretadas (18 %) e as localizadas no espaço extracelular (17 %). Curiosamente e de acordo com a UniProtKB-GOA foram ainda identificadas 2 proteínas (2 %) com localização

nuclear, a proteína *zinc finger* e o domínio SNW da proteína-1 (Figura 4.16). Estas proteínas, à semelhança de outras proteínas nucleares identificadas no proteoma plaquetário, parecem derivar dos megacariócitos (García *et al.*, 2005; Corte *et al.*, 2008).



**Figura 4.16.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS, tendo por base o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA), relativamente à localização celular.

De igual modo, de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas, é notória a semelhança existente na distribuição das proteínas identificadas em ambas as abordagens metodológicas. Assim, segundo a UniProtKB-GOA, de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas, a maioria das proteínas libertadas pelas plaquetas participam em múltiplos processos metabólicos (17 %), na regulação de processos biológicos e celulares (16 %), na mobilidade celular (13 %), no transporte (12 %) e na diferenciação celular (9 %). Em menor quantidade, foram identificadas as proteínas que regulam os processos de morte celular (8 %) e de secreção (1 %), biossíntese (4 %) e a resposta a estímulos (4 %). A análise efectuada em simultâneo através do PANTHER não alterou significativamente a distribuição funcional das proteínas identificadas, verificando-se apenas um maior número de proteínas de transporte (19 %) e das que regulam os processos de secreção (5 %), acompanhado de um menor número de proteínas envolvidas na mobilidade celular (10 %), na diferenciação celular (6 %) e na morte celular (3 %) (Figura 4.17).



**Figura 4.17.** Análise das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS agrupadas relativamente ao processo biológico tendo por base **(A)** o *Gene Ontology Annotation* (UniProtKB-GOA) e tendo por base o **(B)** PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*).

De um modo geral, utilizando 2D-PAGE-MS/MS identificaram-se mais proteínas envolvidas no transporte (19 % de acordo com o PANTHER) e menos proteínas envolvidas na mobilidade celular (13 %), metabolismo (17 %) e resposta a estímulos (4 %), apenas quando foi utilizado o UniProtKB-GOA (Figura 4.16), para além das já identificadas por SDS-PAGE-MS/MS. A listagem das proteínas identificadas por 2D-PAGE-MS/MS, libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, encontra-se representada na Tabela 8.2.

Adicionalmente, é importante realçar que a maioria das proteínas identificadas são maioritariamente libertadas pelos grânulos  $\alpha$ , como a trombospondina, actinina, vWF, PF4 e a sua variante, plasminogénio, albumina, P-selectina, vitronectina, proteína básica das plaquetas e fibrinogénio (cadeia  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ ). Um número ainda elevado de proteínas do citoesqueleto e de ligação à actina, envolvidas na mobilidade celular (10 a 13 %) e com importância na movimentação dos grânulos e no processo de exocitose, como a actina, tropomiosina, vinculina, actinina e anquirina foram também identificadas. As proteínas de transporte (12 a 19 %), algumas delas essenciais no processo de activação plaquetária,

encontram-se também entre as proteínas mais abundantes, incluindo a endoplasmina, transferrina, transterritina, albumina sérica, apolipoproteína A1, proteína 3 rica em cisteína e proteína intracelular dos canais de cloro. Entre as proteínas envolvidas no metabolismo (17 a 19 %), é importante referir que foram identificadas, para além da proteína citoplasmática, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), cinco proteínas mitocondriais: peroxiredoxina-2, glutationa S-transferase, proteína dissulfureto-isomerase, carnitina O-palmitoil transferase 2 e fosfoglicerato cinase 1. Em menor quantidade foram ainda identificadas proteínas envolvidas na diferenciação celular (6 a 9 %) e na regulação de processos biológicos (13 a 16 %), tais como a transgelina-2, factor 2 do crescimento e o plasminogénio; na regulação de processos celulares (16 %), como a talina-1 e nidogénio e na biossíntese (2 a 4 %), como a miotrofina e a  $\alpha$ -actina do músculo-esquelético (Tabela 8.2).

### 3.3. Análise do Efeito do Eptifibatide no Perfil Proteico da Fracção Libertada pelas Plaquetas

A análise comparativa do perfil de *spots* observado nos géis 2D-PAGE (Figura 4.15) revelou uma homologia de 75 % entre as amostras estimuladas com trombina 0,5 U/mL sem tratamento ou pré-tratadas com Eptifibatide 0,1  $\mu$ g/mL (a homologia entre réplicas foi superior a 97 %, evidenciando uma elevada reprodutibilidade). É ainda de salientar que, as amostras estimuladas com trombina, sem tratamento, apresentaram maior número de *spots*, comparativamente às amostras pré-tratadas com Eptifibatide ( $420 \pm 8,49$  vs.  $366 \pm 12,02$ ;  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, observaram-se diferenças significativas nas densidades ópticas de algumas das proteínas identificadas (Tabela 4.7). Fundamentalmente, a libertação de trombospondina-1 (*spot* 1), proteína *beta* (A4) – amilóide (*spot* 2), gelsolina (*spot* 3), carnitina O-palmitoil transferase 2 (*spot* 7), fibrinogénio (cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ ) (*spots* 7 e 10), subunidade *alpha*-1 da F-actina-*capping* (*spot* 8), enolase ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (*spot* 9), transgelina (2 e 3) (*spot* 11), actina citoplasmática (1 e 2) (*spot* 15) e proteína básica das plaquetas, é substancialmente menor nas amostras pré-tratadas com Eptifibatide a 0,1  $\mu$ g/mL ( $p < 0,05$ ). Estas proteínas estão maioritariamente envolvidas no metabolismo e na regulação de processos biológicos.

**Tabela 4.7.** Proteínas diferencialmente libertadas pelas plaquetas após activação com trombina 0,5 U/mL com e sem pré-tratamento com Eptifibatide (0,1 µg/mL), identificadas por 2D-PAGE-MS/MS (para um *protein score* C/% superior a 95%).

Spot	Nome	Nº de Acesso	PM	pI	Nº Péptidos	Protein Score	EPT/TR	Localização Celular	GOA Processo Biológico
1*	Trombospondina-1	P07996	129299,55	4,71	23	143	- 2,42±0,25 <sup>#</sup>	Espaço extracelular	Mobilidade celular/ Processos metabólicos/ Morte celular
2	Proteína beta (A4) - Amilóide	P05067	86888,05	4,73	20	376	- 5,86±0,79 <sup>#</sup>	Membrana	Diferenciação celular/ Morte celular/ Processos metabólicos
3*	Gelsolina	P06396	85644,19	5,9	14	158	- 5,10±2,83 <sup>#</sup>	Citoplasma/ Secretada	Regulação de processos biológicos
4	Proteína dissulfeto-isomerase	P07237	57080,67	4,76	13	428	Apenas detectada na TR	Membrana	Processos metabólicos
5	Coactosina	Q14019	15935,03	5,54	5	187	+ 2,09±1,81	Citoplasma	Mobilidade celular
7	Carnitina O-palmitoil transferase 2	P23786	46707,10	5,37	18	481	- 2,67±0,11 <sup>#</sup>	Citoplasma	Processos metabólicos/ Transporte
7*	Fibrinogénio, cadeia beta	P02675	55892,26	8,54	18	176	- 13,98±1,46 <sup>#</sup>	Membrana/ Secretada	Processos celulares/ Secreção
8	Subunidade <i>alpha</i> -1 da F-actina-capping	P52907	32902,33	5,45	3	168	- 2,28±0,40 <sup>#</sup>	Citoplasma	Mobilidade celular
	<i>alpha</i> -enolase	P06733	47139,32	7,01	16	378		Membrana/ Citoplasma	Regulação de processos biológicos / Diferenciação celular
9*	<i>gamma</i> -enolase	P09104	47239	4,91	7	169	- 4,99±2,86 <sup>#</sup>	Citoplasma	Processos metabólicos
	<i>beta</i> -enolase	P13929	46902,28	7,59	5	157			Processos metabólicos
10	Fibrinogénio, cadeia <i>alpha</i>	P02671	94914,41	5,7	4	70,5	- 3,80±2,88 <sup>#</sup>	Membrana	Transporte/ Processos metabólicos/ Regulação de processos biológicos
	Transgelina-2	P37802	22377,17	8,41	12	223		Membrana	Diferenciação celular
11	Transgelina-3	Q9UJ15	22458,14	6,84	12	71,90	- 9,30±5,08 <sup>#</sup>	Membrana	Diferenciação celular/ Regulação de processos biológicos
	Proteína básica das plaquetas	P02775	13885,42	9,04	2	146		Espaço extracelular / Secretada	Diferenciação celular/ Regulação de processos biológicos

IV – Resultados

12	<i>Ras-related</i> Proteína Rap-1b	P61224	20811,59	5,65	10	233	Apenas detectada na TR	Membrana/ Citoplasma	Processos celulares
	<i>Ras-related</i> Proteína Rap-1A	P62834	20973,71	6,38	9	218		Secretada/ Espaço extracelular	Regulação de processos biológicos
13	Variante do factor plaquetário 4	P10720	11545,28	9,3	4	104	+ 2,41±0,20 <sup>#</sup>	Citoplasma	Processos celulares
	Domínio de ligação da proteína rica em ácido glutâmico SH3	O75368	12766,38	5,22	9	173			
14	<i>alpha</i> -actina	P62736	41981,80	5,23	10	137	+ 1,86±0,08 <sup>#</sup>	Citoplasma	Resposta a estímulos/ Morte celular/ Mobilidade celular/ Diferenciação celular
15	Actina citoplasmática 2	P63261	41765,79	5,31	8	107	- 2,59±0,58 <sup>#</sup>	Citoplasma	Mobilidade celular
	Actina citoplasmática 1	P60709	41709,73	5,29	5	115			
16	Peroxiredoxina-2	P32119	21878,24	5,66	2	78,40	Apenas detectada na EPT	Citoplasma	Processos metabólicos/ Morte celular

**Legenda:** PM – peso molecular; pl – ponto isoelectrico; EPT/TR – rácio entre as densidades ópticas das amostras activadas com Trombina 0,5 U/mL e pré-tratadas com Eptifibatide e das amostras activadas sem qualquer tratamento (controlo) (\* N° do spot do gel onde a proteína identificada se encontra intacta; (<sup>#</sup>) p ≤ 0,05.

Contrariamente, o Eptifibatide induziu um aumento da libertação de coactosina (*spot* 5), da variante do factor plaquetário 4 (*spot* 13), da proteína rica em ácido glutâmico SH3 (*spot* 13) e de actina (*spot* 14). O aumento da libertação de actina, verificado sob acção do Eptifibatide, consolida os resultados obtidos anteriormente por CMF, onde o fármaco provocou um aumento na polimerização de actina, estatisticamente significativo após a estimulação com trombina 0,05 U/mL (Tabela 4.3).

É ainda de realçar que a proteína dissulfureto-isomerase (*spot* 4) e as proteínas *Ras-related* Rap-1b e 1A (*spot* 12) foram apenas detectadas nas amostras correspondentes a proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, enquanto a peroxiredoxina 2 (*spot* 16), foi apenas detectada nas amostras pré-tratadas com Eptifibatide 0,1 µg/mL (Tabela 4.7). O aparecimento da peroxiredoxina 2, uma proteína antioxidante, pode ser o resultado de um efeito protector para a tendência verificada pelo Eptifibatide no aumento da produção de ROS (Tabela 4.6).

Algumas das proteínas identificadas foram observadas em mais do que um *spot* nos géis 2D-PAGE e num peso molecular inferior ao correspondente à proteína, o que sugere alguma actividade proteolítica. Por outro lado, algumas das proteínas analisadas possuem um peso molecular superior, o que indica que estas proteínas possam estar ligadas covalentemente entre si ou a outras proteínas com as quais interagem. Este efeito foi verificado de igual modo para ambas as amostras analisadas.



---

**V – Discussão**

---

## V. DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares de natureza trombótica representam a principal causa de morte no mundo ocidental (Sharon *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2006). Em Portugal, embora se verifique uma tendência para a diminuição das taxas de mortalidade, as doenças cardiovasculares atingem meio milhão de portugueses e são responsáveis actualmente por cerca de 40 % dos óbitos (Portal da Saúde, 2009).

A aterotrombose, a causa mais comum das doenças cardiovasculares, é desencadeada pela ruptura imprevisível e súbita de uma placa aterosclerótica, que causa a activação plaquetária descontrolada, a formação de um trombo e a obstrução parcial ou total das artérias, dando origem aos acidentes aterotrombóticos (Sharon *et al.*, 2004; Patrono *et al.*, 2005; Makiko, 2010). Assim, e desde que as plaquetas foram implicadas na patogénese das doenças cardiovasculares, assiste-se a uma evolução terapêutica exponencial no sentido de potenciar o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, com novos fármacos que permitam o controlo destas doenças e aumentem a esperança média de vida (Kam *et al.*, 2002). Desta forma, desde cedo se começou a recomendar por rotina, para a prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares, a utilização de antiplaquetários, sendo os mais comuns os inibidores das cicloxigenases, como a Aspirina, e os bloqueadores do receptor do ADP, P2Y<sub>12</sub>, como o Clopidogrel, Prasugrel e Ticlopidina (James *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2009; Butt *et al.*, 2010). No entanto, para além dos efeitos benéficos que produzem, estudos recentes referem uma “resistência” à acção da Aspirina<sup>®</sup> e do Clopidogrel num número crescente de pacientes com doenças cardiovasculares (McKee *et al.*, 2004; Matetzky *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2005; Andrew *et al.*, 2007). Por este motivo, nos últimos anos tem-se observado o desenvolvimento de inibidores da GPIIb/IIIa como alternativa terapêutica antiplaquetária, uma vez que são os únicos que bloqueiam directamente a via final comum da activação plaquetária que leva à agregação (Shah *et al.*, 2009). Assim, as *Guidelines* do *American College of Cardiology/ American Heart Association* recomendam a utilização de antagonistas da GPIIb/IIIa no tratamento de pacientes com isquemia tromboembólica do miocárdio, em síndromes coronárias agudas e em complicações isquémicas de intervenção coronária percutânea (Kan *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003). Contrariamente aos inibidores da mesma classe de fármacos, como o Abciximab e o Tirofiban, o Eptifibatide é altamente específico para o receptor da GPIIb/IIIa, e dissocia-se rapidamente deste receptor uma vez interrompida a sua administração, restaurando a agregação plaquetária em aproximadamente 4 horas

(Lorenz *et al.*, 1999). Para além destas vantagens, este fármaco não é imunogénico, não provoca o aparecimento de efeitos adversos quando o tratamento é prolongado e não foram ainda reportados casos de pacientes que apresentem resistência ao seu mecanismo de acção (Eric, 1999; Gilchrist *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no nosso estudo *in vitro*, evidenciaram uma acentuada diminuição na ligação do PAC-1 para concentrações  $\geq 0.01 \mu\text{g/mL}$  ( $p \leq 0,05$ ) de Eptifibatide, após a estimulação plaquetária com os diferentes agonistas utilizados (Figura 4.2), o que corrobora o mecanismo de acção antagonista deste fármaco sobre a GPIIb/IIIa descrito por Lorenz *et al.* (1999). Efectivamente, ao ligar-se à GPIIb/IIIa, o Eptifibatide impede a ligação do anticorpo PAC-1, dirigido ao mesmo local de reconhecimento no receptor (Topol *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2000). Desta forma, o Eptifibatide impede directamente a agregação plaquetária que ocorre através da ligação do fibrinogénio ao seu receptor activado (GPIIb/IIIa) (Michelson *et al.*, 2001; Warltier *et al.*, 2002). Tendo em consideração este efeito, os resultados de agregometria óptica de Born (1962) foram os expectáveis pois evidenciaram uma acentuada inibição da agregação plaquetária pelo Eptifibatide quando esta é induzida pelo ADP ( $10 \mu\text{M}$ ), com um  $\text{IC}_{50}$  de  $0,062 \mu\text{g/mL}$  (Figura 4.3).

Apesar de já descrito o mecanismo de acção do Eptifibatide sobre a GPIIb/IIIa (IMPACT-II Investigators, 1997; Phillips *et al.*, 1997; Michelson *et al.*, 2001), as consequências moleculares e funcionais decorrentes deste mecanismo não são conhecidas e a sua compreensão contribuirá para a optimização da terapia farmacológica utilizada no controlo das doenças cardiovasculares. Neste sentido e utilizando uma abordagem citómica e proteómica, no presente trabalho avaliou-se o efeito do Eptifibatide nos principais mecanismos inerentes à activação plaquetária que incluem a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, as alterações morfológicas das plaquetas, as modificações na geração de ROS e no processo de desgranulação e secreção plaquetária.

A mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tem sido descrita como um dos eventos mais precoces da activação plaquetária (Reed *et al.*, 2000; Michelson *et al.*, 2001). Desta forma, pela acção de diferentes agonistas fisiológicos, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre citoplasmático parece ser responsável pela regulação de respostas celulares, que incluem a activação de cinases e proteases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , a activação das fosfolipases C e  $\text{A}_2$  bem como a activação de alguns produtos do metabolismo do ácido araquidónico (Lawrence, 2003; Brass *et al.*, 2007). Estudos anteriores sugerem que durante o processo de activação plaquetária, as alterações conformacionais da GPIIb/IIIa permitem a esta GP operar como canal para o  $\text{Ca}^{2+}$  bem como proporcionar a exposição

de canais específicos para este catião na superfície plaquetária (Salzman & Ware, 1989; Siess, 1989, Fujimoto *et al.*, 1991). Adicionalmente, e como foi possível verificar através da ferramenta bioinformática *Plug-in Apid* do *Cytoskape* (Figura 4.1) e com base em estudos anteriores (Legate *et al.*, 2009; Raab *et al.*, 2010), a GPIIb/IIIa interage directamente com proteínas que regulam a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  como a integrina 1 e a calreticulina (Tabela 4.1). Os antagonistas da GPIIb/IIIa, incluindo o Eptifibatide inibem a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$ , directamente através da acção exercida sobre este receptor, ou pela impossibilidade da GPIIb/IIIa se ligar a proteínas que regulam este processo (Rybak, 1989; Michelson *et al.*, 2001). Contudo, o efeito deste fármaco sobre o processo de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  parece depender da dose bem como do agonista utilizado na activação plaquetária. Apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas, o Eptifibatide inibiu as respostas de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para concentrações  $\geq 0.01 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 4.2). Contudo, para três (N2, N4 e N5) dos cinco dadores analisados verificou-se uma inibição acentuada na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por este fármaco, após a estimulação das plaquetas com trombina 0,5 U/mL, ADP 5  $\mu\text{M}$  e TRAP 15  $\mu\text{M}$  (Figura 4.4). Estes resultados evidenciam uma marcada variabilidade interindividual, potencialmente associada a polimorfismos genéticos, nomeadamente no gene que codifica a GPIIb/IIIa, como o  $\text{PI}^{\text{A1/A2}}$ , associada à resistência da resposta plaquetária a agonistas e assim a uma menor acção farmacológica (Bray *et al.*, 2001; O' Connor *et al.*, 2001; Wheeler *et al.*, 2002; Rozalski *et al.*, 2005; Falluji & Steinhubl, 2007). Apesar de permanecer ambígua a associação do efeito do Eptifibatide em indivíduos com este genótipo, estudos demonstram que o efeito inibitório dos antagonistas da GPIIb/IIIa é menos eficiente nos indivíduos  $\text{PI}^{\text{A2}}$  (Pascal *et al.*, 1999, Vahid *et al.*, 2007).

No processo de adesão ao endotélio, as plaquetas apresentam alteração da morfologia, passando de discóides a esferóides, com expansão e emissão de pseudópodes e centralização dos grânulos, como resultado da reorganização do citoesqueleto (Michelson *et al.*, 2004; Anjali *et al.*, 2008). Estas alterações morfológicas facilitam não só a adesão das plaquetas ao subendotélio mas também a interacção com outras plaquetas. Assim, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e a interacção de proteínas reguladoras da actina com a membrana plaquetária, resultam num aumento da polimerização de actina (Torti *et al.*, 1994; Andrews *et al.*, 2001). Apesar de não existirem estudos que reportem o efeito da utilização de antagonistas da GPIIb/IIIa na polimerização de actina, está descrito que a ligação do fibrinogénio ao seu receptor activado, em situações normais, regula a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a fosforilação de proteínas envolvidas nas diferentes vias de transdução de sinal e a reorganização do

citoesqueleto (Bearer, 2005; White, 2006). Embora o Eptifibatide tenha diminuído apenas subtilmente a mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, induziu um aumento estatisticamente significativo (para concentrações  $\geq 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) da polimerização de actina quando foi utilizada trombina a  $0,05 \text{ U/mL}$  como agonista fisiológico (Tabela 4.3). Adicionalmente, a análise do perfil das proteínas libertadas pelas plaquetas evidenciou não só um aumento da libertação de  $\alpha$ -actina mas também um aumento da secreção de coactosina (*spot 5*, Figura 4.15), uma proteína que regula inúmeras proteínas de ligação à actina, pelo que tem um papel preponderante na polimerização da actina (Tabela 4.7). Paralelamente, e de forma a complementar a análise das alterações morfológicas consequentes da activação plaquetária, foram ainda quantificadas por CMF alterações nas propriedades de dispersão lateral de luz (SS) da população plaquetária, directamente relacionadas com o tamanho, granularidade e morfologia de superfície (Shattil *et al.*, 1987; Michelson *et al.*, 2007). No entanto, não se verificaram diferenças significativas deste parâmetro para as concentrações de Eptifibatide testadas (Tabela 4.4).

A adesão das plaquetas ao endotélio e o recrutamento plaquetário são respostas de activação fortemente reguladas pela geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Radomski *et al.*, 1987; Graaf *et al.*, 1992). Produzido pelas células endoteliais ou libertado pelas plaquetas após activação com agonistas fisiológicos, o óxido nítrico (NO) é um potente inibidor da agregação, recrutamento plaquetário e formação do trombo. Contudo, as plaquetas activadas também libertam anião superóxido, um radical livre que limita a actividade biológica do NO pela formação de peroxinitrito (Keaney *et al.*, 1999; Heitzer *et al.*, 2003; Freedman *et al.*, 2008). Assim, é o equilíbrio entre os diferentes processos oxidativos que regula a reparação vascular normal. Chakrabarti *et al.* (2004), demonstraram que a utilização de dois antagonistas da GPIIb/IIIa, o Abciximab e o Orbofilan, induz o aumento da libertação plaquetária de NO com diminuição de anião superóxido. Desta forma, os autores demonstraram que, para além de inibir a agregação plaquetária, a utilização de antagonistas da GPIIb/IIIa, é ainda responsável pela activação de outros processos como a produção de NO, que contribuem para a eficácia e manutenção do seu mecanismo de acção, tornando-os a opção ideal no tratamento de pacientes com síndromes coronárias agudas. Apesar de não estar descrito qual o efeito directo do Eptifibatide na produção plaquetária de ROS, os nossos resultados de CMF com DHR123, não evidenciaram diferenças significativas da expressão de ROS entre as diferentes concentrações de Eptifibatide testadas (Figura 4.9). Curiosamente, apenas no secretoma das plaquetas pré-tratadas com Eptifibatide identificamos a peroxiredoxina 2, uma enzima citoplasmática com acção antioxidante importante, nomeadamente na

eliminação de peróxidos formados durante o metabolismo celular (Tabela 4.7). A análise integrada dos resultados sugere que o aumento dos níveis de sistemas antioxidantes, como da peroxiredoxina ou da superóxido dismutase, regula a acção biológica do NO, exercendo um papel fundamental na função plaquetária normal e na prevenção de trombose (Iafrafi *et al.*, 2005; Fredman *et al.*, 2008).

Após activação, as plaquetas sofrem desgranulação e libertam vários factores que para além de serem responsáveis pela activação de outras plaquetas, cicatrização, inflamação, angiogénese, crescimento e adesão celular, podem comprometer a dinâmica vascular (Wagner *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2004). No sentido de compreender de que forma as proteínas libertadas pelas plaquetas influenciam a progressão da lesão aterosclerótica, e com o propósito de descobrir novos biomarcadores para os eventos cardiovasculares tem-se notado na literatura um interesse crescente na caracterização do secretoma das plaquetas (Coopinger *et al.*, 2004 e 2007; Piersma *et al.*, 2009). No presente estudo, avaliou-se, qualitativa e quantitativamente, o efeito do Eptifibatide no perfil proteico secretado pelas plaquetas por 2D-PAGE-MS/MS. Apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas na expressão de P-selectina (Figura 4.8) para as concentrações de Eptifibatide testadas, observaram-se alterações da fracção proteica libertada pelas plaquetas induzidas por este fármaco, após estimulação com trombina 0,5 U/mL (Figura 4.15). Apesar de aparentemente paradoxal, também alguns autores defendem que o processo de desgranulação é inibido pela acção de antagonistas de GPIIb/IIIa (Peter *et al.*, 1998; Chandler *et al.*, 2005), enquanto outros demonstram que esta proteína se expressa de igual modo na superfície plaquetária sob acção destes fármacos, apesar do conteúdo proteico libertado pelas plaquetas poder diferir (Holmes *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2000). Assim, estes resultados sugerem que as alterações que envolvem o processo de secreção podem também estar relacionadas com os mecanismos de transporte do conteúdo dos grânulos, e não apenas com a exocitose e fusão membranar. Mais do que diferenças qualitativas, os dados obtidos sugerem que de uma maneira geral o Eptifibatide induz menor secreção de proteínas (Figura 4.15). A análise por 2D-PAGE-MS/MS do secretoma plaquetário evidencia uma diminuição acentuada da libertação de proteínas, por acção do Eptifibatide, relacionadas fundamentalmente com a hemostase, como: a trombospondina-1 (*spot 1*) e o precursor da proteína *beta* (A4) (*spot 2*) – amilóide, ambas envolvidas na adesão das plaquetas ao endotélio; o fibrinogénio (cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ ) (*spot 7*), essencial no processo de agregação plaquetária; e a proteína básica das plaquetas (*spot 11*), que regula, através de mecanismos de transdução de sinal, a activação e a desgranulação plaquetária (Tabela

4.7). Este fármaco induziu ainda uma menor libertação de proteínas envolvidas na regulação de processos biológicos e na diferenciação celular como: a gelsolina (*spot 3*), envolvida na formação dos filamentos de actina; a subunidade *alpha-1* da F-actina-*capping* (*spot 8*), envolvida na resposta imunológica e na mobilidade celular através da organização do citoesqueleto; a enolase ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (*spot 9*), enzima multifuncional responsável pela activação do plasminogénio, imprescindível no processo de fibrinólise; e a transgelina (*spot 11*), que regula a diferenciação e a mobilidade celular (Tabela 4.7). Ao diminuir a secreção de proteínas envolvidas na hemostase, nomeadamente o fibrinogénio e a proteína básica das plaquetas, o Eptifibatide tem um papel fundamental na prevenção da formação do trombo e no desenvolvimento de aterosclerose.

A abordagem proteómica utilizada, que envolveu fundamentalmente a separação proteica por SDS-PAGE ou 2D-PAGE, seguida da digestão enzimática e da identificação das proteínas por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) provou ser uma ferramenta poderosa na identificação das proteínas libertadas pelas plaquetas e no estudo de agentes antiplaquetários. Aliada à avaliação das respostas de activação plaquetária, por CMF e por agregometria óptica, tornou possível a análise integrada do efeito do Eptifibatide na funcionalidade das plaquetas, crucial para a avaliação terapêutica de doenças trombóticas e hemorrágicas. Além de inibir directamente a agregação plaquetária, ao bloquear a GPIIb/IIIa, os nossos resultados sugerem que o Eptifibatide influencia ainda outros mecanismos de sinalização intracelular, que regulam as alterações morfológicas das plaquetas, a produção de ROS e o processo de desgranulação e secreção.

Estudos futuros utilizando abordagens metodológicas de LC-MS/MS com iTRAQs serão importantes para complementar a informação obtida da análise do 2D-PAGE-MS/MS, uma vez que permitem fazer a análise quantitativa das proteínas identificadas no secretoma das plaquetas.

Adicionalmente, a análise da expressão de algumas proteínas alvo imprescindíveis na activação plaquetária, nomeadamente a trombospondina-1, o fibrinogénio e a proteína básica das plaquetas, utilizando CMF ou *Western blotting*, permitirá validar os resultados obtidos relativamente à acção do Eptifibatide. A avaliação da expressão e/ou actividade das enzimas NO sintetase e NADPH oxidase permitirá avaliar o efeito do Eptifibatide na produção específica de NO e de anião superóxido, respectivamente, visto que, ao poderem contribuir para a eficácia e manutenção da inibição da agregação plaquetária, tornam a utilização deste fármaco fundamental no tratamento de pacientes com síndromes coronários agudos.

---

## **VI – Conclusão**

---



## VI. CONCLUSÃO

Com o intuito de avaliar o efeito do Eptifibatide nas respostas de activação plaquetária, foi delineado um protocolo experimental que envolveu a avaliação funcional das plaquetas, utilizando o método clássico de agregometria óptica e a análise de vários parâmetros bioquímicos de activação plaquetária por CMF (abordagem citómica), em complementaridade com a caracterização das alterações induzidas pelo Eptifibatide no secretoma das plaquetas, através de metodologias proteómicas. Os resultados obtidos permitiram-nos inferir as seguintes conclusões:

- i) Na análise da funcionalidade plaquetária, o Eptifibatide para além de inibir directamente a agregação plaquetária ao bloquear a GPIIb/IIIa, influencia outros mecanismos de sinalização intracelular, directamente através da acção exercida sobre este receptor, ou pela alteração das interacções estabelecidas entre a GPIIb/IIIa com proteínas que regulam muitos dos mecanismos envolvidos nas respostas de activação plaquetária. De uma maneira geral, verificou-se que o Eptifibatide:
  - i. Tem tendência a inibir a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular,
  - ii. Induz um aumento na polimerização de actina, monitorizado pela formação de F-actina, após a estimulação com trombina 0,05 U/mL. Adicionalmente, provoca a libertação em maior quantidade de actina e de coactosina.
  - iii. Aumenta tendencialmente a produção plaquetária de ROS e provoca a libertação de uma proteína antioxidante, a peroxiredoxina 2.
  - iv. Apesar de não afectar a expressão de P-selectina na superfície plaquetária altera a fracção proteica libertada pelas plaquetas.
- ii) É de salientar a grande variabilidade interindividual observada no efeito das diferentes concentrações de Eptifibatide nas respostas de activação analisadas por CMF. Estas diferenças foram notórias em todos os parâmetros analisados, para os diferentes agonistas e concentrações testadas.
- iii) As optimizações efectuadas ao protocolo de Piersma *et al.* (2009) do isolamento da fracção proteica libertada pelas plaquetas, demonstraram reduzir a activação

artefactual das plaquetas, inerente às centrifugações utilizadas na metodologia. Desta forma, a metodologia aplicada, melhorou substancialmente as respostas induzidas pela trombina, podendo ser implementada em estudos futuros.

- iv) A maioria das proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina a 0,5 U/mL, participam na mobilidade celular e em múltiplos processos metabólicos relacionados com a hemostase e a inflamação.
  
- v) Foram observadas diferenças significativas no perfil proteico do secretoma das plaquetas, entre as amostras estimuladas com trombina 0,5U/mL e as amostras pré-tratadas com Eptifibatide 0,1 µg/mL. Fundamentalmente, o Eptifibatide diminuiu a libertação de proteínas envolvidas no metabolismo, diferenciação celular e regulação de processos biológicos.

De um modo geral, os nossos resultados demonstram que a utilização de uma abordagem metodológica integrada, na monitorização do efeito do Eptifibatide na funcionalidade das plaquetas, é fundamental para elucidar os mecanismos segundo os quais o fármaco em estudo influencia as respostas de activação plaquetária, imprescindível na correcta avaliação e monitorização terapêutica das doenças cardiovasculares.

---

## VII – Referências Bibliográficas

---

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaron, J. (1977). Platelet Function. *N Engl J Med*, 280: 1330-1335.
- Aguilar, M. I., Hart, R., Pearce, L. A. (2009). Oral anticoagulants versus antiplatelet therapy for preventing stroke in patients with non-valvular atrial fibrillation and no history of stroke or transient ischemic attacks (Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 1: pp. 1-22.
- Alberts, M. (2005). Can point-of-care platelet-function tests be used to screen for aspirin responsiveness after TIA and stroke? *Nature Reviews Neurology*, 1: 76-77.
- Amado, F. M., Vitorino, R. M., Domingues, P. M., Lobo, M. J., & Duarte, J. A. (2005). Analysis of the human saliva proteome. *Expert Review of Proteomics*, 2 (4): 521-539.
- Andrews, R., Gardiner, E., Shen, Y., & Berndt, M. (2004). Platelet Interactions in Thrombosis. *IUBMB Life*, 56 (1): 13-18.
- Anjali, A., & Sharathkumar, A. (2008). Platelet Function Disorders. *Treatment of Hemophilia*, 2 (19): 1-12.
- Ardissino, D., Mannucci, P. M., Merlini, P. A., Duca, F., Fetiveau, R., Tagliabue, L., Tubaro, M., Galvani, M., Ottani, F., Ferrario, M., Corral, J., & Margaglione, M. (1999). Infarction Prothrombotic Genetic Risk Factors in Young Survivors of Myocardial. *Blood*, 94 (1): 46-51.
- Bearer, E. (2005). Platelet Function. Structure-Function of the Platelet Cytoskeleton. *Contemporary Cardiology*, 1: 71-114.
- Bennett, J.S. (1991). Molecular biology of platelet membrana glycoproteins. *Blood*, 27: 186-204.
- Berndt, M., & Andrews, R. (2004). Approaches to the analysis of structure/function of novel membrane receptors: A functional dissection of platelet GP Ib-IX-V. *Int J Pept Res Therapeut*, 8 (5): 163-169.
- Bessis, M. (1973). Living blood cells and their ultrastructure. In: *Springer-Verlag, New York*; Issue 1: pp. 146-155.
- Bervers, E. M., Comfurius, P., & Zwaal, R. (1983). Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Biochem Biophys Act*, 736: 57-66.
- Born, G. V. R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194: 927-9.
- Brass, L. F., Manning, D. R., & Cichowski, K., Arams, C. S. (1997). Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Tromb Haemost*, 78 (1): 581-589.
- Bray, P. F., Cannon, C. P., & Goldschmidt-Clermont, P. (2001). The platelet P1<sup>A2</sup> and angiotensin-converting enzyme (ACE) D allele polymorphisms and the risk of recurrent events after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 88: 347-352.
- Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., & Nurden, A. (1981). Defective alpha-granule production in megacaryocytes from gray platelet syndrome: Ultrastructural studies of bone marrow cells and megacaryocytes growing in culture from blood precursors. *Am J Pathol*, 102 (1): 10-19.

- Burstein, S. A. & Breton-Gorius, J. (1995). Megakaryopoiesis. *McGraw-Hill*, 95 (4): 704-705.
- Butt, J. (2010). Review of a new antiplatelet agent: Focus on prasugrel. *PharmaNote*, 4 (26): 1-9.
- Cervi, D., Yip, T., Bhattacharya, N., Podust, V., Peterson, J., Abou-Slaybi, A., Naumov, N., Bender, E., Almog, N., Italiano, E., Folkman, J., Klement, L. (2008). Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood*, 111 (3): 1201–1207.
- Chandler, B., Kueter, T., Hansen, J., & Jennings, L. (2005). Regulation of CD154 (CD40L) and CD62 (p-selectin) Cell Surface Density May Be a Critical Mechanism in Conferring Proinflammatory and Prothrombotic Effects. *J Thromb Haemost*, 3 (1): 10-13.
- Coller, B. S. (1997) GPIIb/IIIa antagonists: Pathophysiologic and therapeutic insights from studies of c7E3 Fab. *Thromb Haemost*, 78 (1): 730-735.
- Coppinger, J. A., Cagney, G., Toomey, S., & Kislinger, T. (2004). Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, 103 (6): 2096-2104.
- Coppinger, J., O'Connor, R., Wynne, K., Flanagan, M., Sullivan, M., Maguire, P., Fitzgerald, D., & Cagney, G. (2007). Moderation of the platelet releasate response by aspirin. *Blood*, 109 (11): 4786-4792.
- Corral, J., González-Conejero, R., Hernández-Espinosa, D., Martínez, C., & Vicente, V. (2005). Genómica y proteómica en hemostasia. *Haematologica*, 90 (I): 65-70.
- Cristea, I. M., Gaskell, S. J., & Whetton, A. D. (2004). Proteomic techniques and their application to hematology. *Blood*, 103 (10): 3624-34.
- Crosby, D., & Poole, A. (2004). Platelet Dense-Granule Secretion The [<sup>3</sup>H]-5-HT Secretion Assay. *Meth Mol Biol*, 272 (I): 95-96.
- Corte, A., Maugeri, N., Pampuch, A., Cerletti, C., Gaetano, G., Rotilio, D. (2008). Application of 2-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) to the study of thrombin-activated human platelet secretome. *Platelets* 19 (1): 43-50.
- Dalby, M., Montalescot G., Sollier, C., Soulat, E., Collet, J., Choussat, R., Gallois, V., Drobinski, G., Drouet, L., & Thomas, D. (2004). Results of the platelet activity extinction in Non-Q-Wave myocardial infarction with aspirin, clopidogrel, and eptifibatide (PEACE) study. *J Am Coll Cardiol*, 43: 162-168.
- Dangelmaier, D. J., & Jin, J. G. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem*, 273 (4): 2030-2034.
- Dangelmaier, D. J., & Jin, J. G. (1999). Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost*, 82 (4): 1322-1326.
- Davi, G., & Patrono, C. (2007). Platelet Activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 357: 2482-94.
- Escolar, G., Krumwiede, M., & White, J.G. (1986). Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathology*, 123 (1): 86-94.

- Falluji, N., & Steinhubl, S. (2007). Variable response to antiplatelet therapy: what does it mean to clinicians? *Clinical Journal of Medicine*, 74 (1): 49-55.
- Ferguson, J., & Lau, T. (1998). New antiplatelet agents for acute coronary syndromes. *Cardiology Research*, 10: A4-A12.
- Fey, S. J., & Larsen, P. M. (2001). 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol*, 5 (1): 26-33.
- Fitzgerald, M. L., & Reed, G. L. (1999). Rab6 is phosphorylated in thrombin-activated platelets by protein kinase C-dependent mechanism: Effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem J*, 342 (2): 353-360.
- Flaumenhaft, R. (2003). Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1152-1160.
- Fortuna, M., Monteiro, M. C., Gonçalves, M. J., & O'Connor, J. E. (2005). Flow cytometric kinetic assay of reactive oxygen species (ROS) in whole blood platelets: a simple assay to assess oxidative stress in blood cells. *9º Congresso Sociedade Ibérica de Citometria*: pp. 18-21.
- Freedman, J., & Keaney, J. (1999). NO and superoxide in human platelets. In: *Packer L, editor. Nitric oxide, Part C: biological and antioxidant activities*, pp. 61-7.
- Frojmovic, M. (1996). Flow cytometric analysis of platelet activation and fibrinogen binding. *Platelets*, 7 (2): 9-21.
- Fundação Portuguesa de Cardiologia (2010). Doenças Cardiovasculares. Disponível [on line]: <http://www.fpcardiologia.pt/fund.html>.
- Furman, M. I., Gardner, T. M., & Goldschmidt-Clermont, P.J. (1993). Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemost*, 70 (1): 229-232.
- Furman, M., Krueger, L., Linden, M., Barnard, M., Frelinger, A., & Michelson A. (2004). Release of Soluble CD40L From Platelets Is Regulated by Glycoprotein IIb/IIIa and Actin Polymerization. *J American Coll Cardiol*, 43 (12): 2319-2325.
- García, A., Prabhakar, S., Brock, C. J., & Pearce, A. C. (2004). Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4 (3): 656-668.
- García, A., Watson, S. P., Dwek, R. A., & Zitzmann, N. (2005). Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrometry Reviews*, 24 (6): 918-930.
- García, A., Smalley, M., Cho, H., Shabanowitz, J., Ley, K., Hunt, D. (2005). The Platelet Microparticle Proteome. *J Proteome Res*, 4 (5): 1516-1521.
- García, A., Senis, Y., Tomlinson, M., & Watson, S. (2007). Platelet Genomics and Proteomics. *Platelet*, 2 (5): 99-116.
- García, A. (2008) Proteómica aplicada al estudio bioquímico de las plaquetas sanguíneas y sus vías de activación. *Proteómica*, 1: 19-26.
- Gartner, K., Derrick, J., Taylor, D., & Loudon, R. (1997). The peptide LSARLAF causes platelet secretion and aggregation by directly activating the integrin  $\text{IIbB}_3$ . *Biochem J*, 325 (2): 309-313.

- Gibbins, J. (2004). Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *Journal of Cell Science*, 117 (6): 3415-3425.
- Gilchrist, I. C. (2003). Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in percutaneous coronary intervention: focus on the pharmacokinetic pharmacodynamic relationships of eptifibatide. *Clin Pharmacokinet*, 42 (8): 703–720.
- Givan, A.L. (1992). Flow Cytometry - First principles. In: Wiley-Liss, New York; pp. 200-256.
- Gleissner, C. A., vonHundelshausen P., & Ley K. (2008). Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 28: 1920-7.
- Gnatenko, D.V. (2003). Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood*, 101 (6): 2285–2293.
- Gnatenko, D. V., Perrotta, P. L., & Bahou, W. F. (2006). Proteomic approaches to dissect platelet function: half the story. *Blood*, 108 (13): 3983–3991.
- Gonzalez-Conejero, R., Lozano, M., Rivera, J., Corral, J., Iniesta, J., Moraleda, J., & Vicente V. (1998). Polymorphisms of Platelet Membrane Glycoprotein Ibalpha Associated With Arterial Thrombotic Disease. *Blood*, 92 (8): 2771-2776.
- Gorg, A., Boguth, G., Kopf, A., Reil, G., Parlar, H., & Weiss, W. (2002). Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics*, 2 (12): 1652-1657.
- Graaf, J. C., Banga, J. D., Moncada, S., Palmer, R. M., Groot, P. G., & Sixma, J. J. (1992). Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*, 85 (6): 2284 –2290.
- Gravel, P. (1995). Human blood platelet protein map established by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 16 (7): 1152–1159.
- Gunay-Aygun, M., Huizing, M., & Gahl, W. (2004). Molecular defects that effect platelet dense granules. *Sem Thromb Hemost*, 30 (5): 537-547.
- Gwenda, G., Qiansheng, R., Dilks, J., Blair, P., Whiteheart, S., & Flaumenhaft, R. (2009). Endobrevin/VAMP-8–dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo. *Blood*, 114 (5): 1083-1090.
- Halkier, T. (1991). Regulation of blood coagulation. In: *Mechanisms in Blood Coagulation, Fibrinolysis and the Complement*. London:Cambridge Univ. Press. Issue 1, pp. 104-126.
- Han, D., Zhou, H., & Aebersold, R. (2001). Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 19 (10): 946-951.
- Harrison, P. (2005). Platelet function analysis. *Blood Review*, 19 (2): 111-23.
- Harrison, P., & Keeling, D. (2007). Clinical tests of platelet function. *Platelet*, 2 (23): 445-466.
- Heitzer, H., Ollman, I., Koke, K., Meinertz, T., & Munzel, T. (2003). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade improves vascular nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 108 (5): 536-41.

- Helley, D., Banu, E., Bouziane, A., Banu, A., Scotte, F., Fischer, A., & Oudard, S. (2009). Platelet Microparticles: A Potential Predictive Factor of Survival in Hormone-Refractory Prostate Cancer Patients Treated with Docetaxel-Based Chemotherapy. *Europeanurology*, 56 (3): 479-485.
- Henn, V., Slupsky, J., Grafe, M. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391 (6667): 591-4.
- Hilberg, T., Schmidt, V., Lösche, W., & Holger, H. (2003). Platelet Activity and Sensivity to Agonists After Exhaustive Treadmill Exercise. *J Sports Sci Med*, 2: 15-22.
- Hoheisel, J. D. (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*, 7 (3): 200-210.
- Holloway, A. J., van Laar, R. K., Tothill, R. W., & Bowtell, D. D. (2002). Options available—from start to finish—for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat Genet*, 32 (1): 481–489.
- Huang, E. M., & Detwiler, T. C. (1981). Characteristics of the Synergistic Actions of Platelet Agonists. *Blood*, 57 (4): 685-691.
- Iafrafi, M., Vitseva, O., Tanriverdi, K., Blair, P., Rex, S., Chakrabarti, S., Varghese, S., & Freedman, J. E. (2005). Compensatory mechanisms influence hemostasis in setting of eNOS deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288 (4): H1627–H1632.
- Iain, C., Carr, P., Gusnanto, A., Ouwehand, W., Fitzgerald, D., & Watkins, N. (2005). Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest*, 115 (12): 3370-3377.
- IMPACT-II Investigators (1997). Randomised placebo-controlled trial of effect of Eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. Integrilin to Minimise Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis. *Lancet*, 349 (9063): 1422-1428.
- James, E., Kitt, M., Kleiman, N., Talley, D., Aguirre, F., Davidson, C., Runyon, J., & Iain, C., Conor O'Shea, J., Kosoglou, T., Jennings, L., Todd, J., & Lorenz, M., (2001). Percutaneous Coronary Intervention Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Higher-Dose, Double-Bolus Eptifibatide in Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation*, 104 (4): 406-411.
- Jennings, L., & White, M. (2007). Platelet Aggregation. *Platelet*, 2 (26): 495-506.
- Jenny, A., Rodriguez, O., Sharma, S., Jayasundera, T., Badimon, J., & Marmur, J. (2004). Eptifibatide provides additional platelet inhibition in Non–ST-Elevation myocardial infarction patients already treated with aspirin and clopidogrel. *J Am Coll Cardiol*, 43 (2): 162-168.
- Jiménez, C. R., Piersma, S., & Pham, T. V. (2007). High-throughput and targeted in-depth mass spectrometry-based approaches for biofluid profiling and biomarker discovery. *Biomarkers Med*, 1 (4): 541-65.
- Jin, J, & Dangelmaier, C. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem*, 273 (4): 2024-2029.
- Jiuhong Y., Carolyn, U., & Hyeong-Reh, C. (2003). Platelet-derived Growth Factor Signaling and Human Cancer. *J Biochem Mol Biol*, 36 (1): 49-59.
- Jonathan, F., Smith, C., & Wood, B. (2002). Measurement of Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes and Platelets by Whole-Blood Flow Cytometry with Annexin V. *Blood Cell Mol Dis*, 25 (5): 271-278.



- Jurk, K., & Kehrel B. (2007). Inherited and acquired disorders of platelet function. *Transfus Med Hemother*, 35: 6-19.
- Kakkar, A. K. (2002). The Uneasy Relationship Between Cancer and Platelets. *The Lancet Oncology*, 3 (10): 425-430.
- Kam, P., & Egan, M. (2002). Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists. Pharmacology and Clinical Developments. *Anesthesiology*, 96 (5): 1237-49.
- Kanthou C., Benzakour O., Patel G., Deadman J., Kakkar V., & Lupu F (2005). Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP) stimulates Mitogenesis, C-FOS and PDGF-A Gene Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Thromb Haemost*, 74 (5): 1340-1347.
- Karniguin, A., Zahraoui, A., & Tavitian A. (1993). Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: Thrombin-induced phosphorylation of Rab3b, Rab6 and Rab8 proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 90 (16): 7647-7651.
- Kieffer, N., & Phillips, D. (1990). Platelet membrane glycoproteins: function in cellular interactions. *Ann Rev Cell Biol*, 6: 329-357.
- King, S. M., McNamee, R. A., & Hounq A. K., Patel R., Brands M., Reed G. L. (2009). Platelet dense-granule secretion plays a critical role in thrombosis and subsequent vascular remodeling in atherosclerotic mice. *Circulation*, 20 (9): 785-91.
- Klement, L., Yip, T., Cassiola, F., Kikuchi, L., Cervi, D., Podust, V., Italiano, E., Wheatley, E., Abou-Slaybi, A., Bender, E., Almog, N., Kieran, W., & Folkman, J. (2009). Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*, 113 (12): 2835-2842.
- Klouche, M. (2007). Diagnostic Methods for Platelet Function Analysis. *Transfus Med Hemother*, 34: 20-32.
- Konopatskaya, O., & Poole, A. (2010). Protein kinase C $\alpha$ : disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci*, 31 (1): 8-14.
- Kujawski, M., Hussain, W., Chyna, B., Kahn, S., Hoppensteadt, D., Leya, F., & Farred, J. (2004). Biomarker profiling of plasma from acute coronary syndrome patients. Application of Protein Chip Array analysis. *Int Angiol*, 23 (3): 246-254.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.
- Lakhey, M., Agarwal, A., & Badhe, B. (2005). Platelet aggregometric study on whole blood of patients with ischaemic heart disease. *Kathmandu University Medical Journal*, 3 (9): 11-16.
- Lapetina, E. G., Lacal, J. C., Reep, B. R., & Vedia, L. M. (1989). A ras-related protein is phosphorylated and translocated by agonists that increase cAMP levels in human platelets (ras-encoded protein antibodies/G proteins/cAMP-dependent protein kinase/platelet activation/signal transduction). *Biochemistry*, 86 (9): 3131-3134.
- Lawrence, F., Timothy, J., Zhu, L., & Woulfe, D. (2006). Signal Transduction During Platelet Plug Formation. *Platelets*, 2 (16): 319-346.
- Lawrence, L., Wenche, J., Yeon, S., Zivadinov, R., Maghzi, A., Etemadifar, M., Steven, A., & Minagar, A. (2010). Role of platelets in neuroinflammation: a wideangle perspectivel. *J Neuroinflam*, 7 (10): 2-22.

- Leal, J. (2006). Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J*, 27 (13): 1610-1619.
- Lee, T., Hillman, R., Coller, B., Smith, J., Steinhubl, S., Lincoff, A., & Coleman, J. (1999). Cartridge-Based Method Rapid Platelet-Function Assay: An Automated and Quantitative. *Circulation*, 99 (5): 620-625.
- Lefebvre, P., White, J., Krumwiede, M., & Cohen, I. (1993). Role of actin on platelet function. *Eur J Cell Biol*, 62 (2): 194-204.
- Legate, K., & Fassler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci*, 122 (2): 187–198.
- Lennon, M. J., Gibbs, N. M., Weightman, W. M., McGuire, D., & Michalopoulos, N. (2004). A comparison of Plateletworks and platelet aggregometry for the assessment of aspirin-related platelet dysfunction in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 18 (2): 136–40.
- Léon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J., & Gachet, C. (2003). Differential Involvement of the P2Y1 and P2Y12 Receptors in Platelet Procoagulant Activity. *Arteriosc Thromb Vasc Biol*, 23 (10): 1941-1947.
- Leung, L., Lawrence, L., & Gibbs, C. (2002). Modulation of thrombin's procoagulant and anticoagulant properties. *Tromb Haemost*, 78 (1): 577-580.
- Leung, L., & Nachman, R. (1986). Molecular mechanisms of platelet aggregation. *Annu Rev Med*, 37: 179-86.
- Lev, E. L., Osende, J. L., Richard, M. F., & Robbins, J. A. (2001). Administration of Abciximab to Patients Receiving Tirofiban or Eptifibatid: Effect on Platelet Function. *J Am Coll Cardiol*, 37 (3): 847-855.
- Long, M., & Hoffman, R. (1995) Thrombocytopenias. In: *Churchill Livingstone, New York*; pp. 302-310.
- Lorenz, T., Macdonald, F., & Kitt, M. (1999). Nonimmunogenicity of eptifibatid, a cyclic heptapeptide inhibitor of platelet glycoprotein IIb–IIIa. *Clin Ther*, 21 (1): 128–137.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 193 (1): 265–275.
- Lutgens, E., & Daemen, M. (2002). CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 12 (1): 27–32.
- Maguire, P. B., Wynne, K. J., Harney, D. F., O'Donoghue, N. M., Stephens, G., & Fitzgerald, D. J. (2002). Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics*, 2 (6): 642-648.
- Makikko, U. (2010). Pathology of AtheroThrombosis (ATIS). *Drugs*, 70 (3): 3-8.
- Mann, M. (1999). Quantitative proteomics? *Nat Biotechnol*, 17: 954-956.
- Mason, P., Jacobs, A., & Freedman, J. (2005). Aspirin Resistance and Atherothrombotic Disease. *J Am Coll Cardiol*, 48 (4): 846-847.

- Mateos, C., García, M., López, F., Macava, C., Núñez, A., Gómez, J., Alonso, S., Carrasco, C., Burgos, M., Granizo, J., Farré, J., & Rico, L. (2004). Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 44 (8): 1578-1583.
- McNicol, A., & Robson, C. (1997). Thrombin Receptor-Activating Peptide Releases Arachidonic Acid from Human Platelets: A Comparison with Thrombin and Trypsin1. *Pharmacol Rev*, 281 (2): 861-867.
- McNicol, A., & Israels, S. (1999). Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thromb Res*, 95 (1): 1-18.
- McRedmond, J., Park, D., Reilly, J., Coppinger, P., Maguire, D., Shields, C., & Fitzgerald, J. (2004). Integration of Proteomics and Genomics in Platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics*, 25 (2):133-44.
- Merten, M., Rajbabu, P., Thiagarajan, M., & Benedict, C. (1999) Platelet Microparticles Promote Platelet Interaction With Subendothelial Matrix in a Glycoprotein IIb/IIIa–Dependent Mechanism. *Circulation*, 99 (19): 2577-2582.
- Metzelaar, M., & Clevers, H. (1992). Lysosomal Membrane Glycoproteins in Platelets. *Thromb Haemost*, 68 (4): 378-382.
- Michelson, A. (1996). Flow Cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*, 87 (12): 4925-36.
- Michelson, A., Furman, M. I., Goldschmidt-Clermont, P., Mascelli M. A., Hendrix C., Coleman L., & Hamlington J. (2000). Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation*, 101 (9): 1013–1018.
- Michelson, A., Ellis, P. A., Barnard, M. R., Matic, G. B., Viles, A. F., & Kestin, A. S. (2001). Down-regulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vivo wound. *Blood*, 77 (4): 770-779.
- Michelson, A., Frelinger, A., Furman, M., Krueger, L., & Barnard, M. (2001). Dissociation of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists From Platelets Does Not Result in Fibrinogen Binding or Platelet Aggregation. *Circulation*, 104 (12): 1374-1379.
- Michelson, A. (2004). Platelet Function Testing in Cardiovascular Diseases. *Circulation*, 110 (19): 489-493.
- Michelson, A., Linden, M., Barnard, M., Furman, M., & Frelinger, A. (2007). Flow Cytometry. *Platelet*, 2 (30): 545-556.
- Miki, M., Remedios, C., Phillips, L., & Hambly, B. (1987). Interaction of phalloidin with chemically modified actin. *Eur J Biochem*, 165 (1): 125-130.
- Minta, A., Kao, J., & Tsien, R. (1989). Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores. *J Biol Chem*, 264 (14): 8171-8178.
- Monteiro, M. C., Sansonetty, F., Gonçalves, M. J., & O'Connor, J. E. (1999). Flow cytometric kinetic assay of calcium mobilization in whole blood platelets using Fluo-3 and CD41. *Cytometry*, 35 (4): 302-310.
- Monteiro, M. C., Gonçalves, M. J., Sansonetty, F., & O'Connor, J. E. (2000). Multiparametric Analysis of Early Events in Platelet Activation Using Whole Blood and Flow Cytometry. *J Thromb Haemost*, 10 (5): 140a.

- Morel, O. (2006). Procoagulant Microparticles - Disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 26 (12): 2594-2604.
- Moriau, M., Lavenne, E. P., Scheiff, J. M., & Debeys, C. C. (1990). The relationship between endothelium, subendothelium, and platelets. *Blood Cells*, 16: 73-83.
- Nannizzi-Alaimo, L., Alves, V., & Phillips, D. (2003). Inhibitory Effects of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists and Aspirin on the Release of Soluble CD40 Ligand During Platelet Stimulation. *Circulation*, 107 (8): 1123-1128.
- O'Connor, F., Shields, D., & Fitzgerald, A. (2001). Genetic variation in glycoprotein IIb/IIIa as a determinant of the responses to an oral GPIIb/IIIa antagonist in patients with unstable coronary syndromes. *Blood*, 98 (12): 3256-3260.
- O'Connor, R., Cryan, L., Wynne, K., Stefani, A., Fitzgerald, D., O'Brien, C., & Cagney, G. (2010). Proteomics Strategy for Identifying Candidate Bioactive Proteins in Complex Mixtures: Application to the Platelet Releasate. *J Biomed Biotechnol*, 1: 1-12.
- Oda, A., Daley, J., Cabral, C., Kang, J., Smith, M., & Salzman, E. (1994). Heterogeneity in filamentous actin content among individual human blood platelets. *Blood*, 79 (4): 920-927.
- O'Neill, E. E. (2002). Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics*, 2 (3): 288-305.
- Panzer, S., Hocker, L., & Koren, D. (2006). Agonists-induced platelet activation varies considerably in healthy male individuals: studies by flow cytometry. *Amn Hematol*, 85 (2): 121-125.
- Pascal, J., Roos, C., & Cooke, G. (1999). Platelet PIA2 Polymorphism and Thromboembolic Events: From Inherited Risk to Pharmacogenetics. *J Thromb Thrombolysis*, 8 (2): 89-103.
- Patrono, C., Rodríguez, L., Landolfi, R., & Baigent, C. (2005). Low-Dose Aspirin for the Prevention of Atherothrombosis. *N Engl J Med*, 353 (22): 2373-2383.
- Peerschke, E. I. (1992). Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Clin Pathol*, 98 (4): 455-463.
- Peter, K., Schwarz, M., & Ylanne, J. (1998). Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Blood*, 92 (9): 3240-3249.
- Phillips, D., Teng, W., & Arfsten, A. (1997). Effect of calcium on GP IIb/IIIa interactions with Integrilin: enhanced GPIIb/IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium plasma anticoagulated with citrate. *Circulation*, 96 (5): 1488-1494.
- Piersma, S., Broxterman, H., Kapci, M., Haas, R., Hoekman, K., Henk, M., & Jiménez, C. (2009). Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate. *Journal of Proteomics*, 72 (1): 91-109.
- Pietramaggiore, G., Scherer, S., Cervi, D., Klement, G., & Orgill, P. (2008). Tumors stimulate platelet delivery of angiogenic factors *in vivo*: an unexpected benefit. *Am J Pathol*, 173 (6): 1609-1616.
- Pietro, D., & Dell'angelica, E. (2005). The cell biology of Hermansky-Pudlak syndrome: Recent advances. *Traffic*, 6 (7): 525-533.

- Polanowska-Grabowska, R., Geanacopoulos, M. & Gear, A. (1993). Platelet adhesion to collagen via the  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  integrin under arterial flow conditions causes rapid tyrosine phosphorylation of pp125FAK. *Biochem J*, 296 (3): 543-547.
- Portal da Saúde (2009). Doenças do Aparelho Circulatório. Disponível [on line]: <http://www.portaldasaude.pt>.
- Posan, E., McBane, R., Grill, D., Motsko, C., & Nichols, W. (2003). Comparison of PFA-100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. *Thromb Haemost*, 90 (3): 483-90.
- Prentice, H., & Webster, K. (2004). Genomic and Proteomic Profiles of Heart Disease. *Trends Cardiovasc Med*, 14 (7): 282-288.
- Quiansheng, R., Shaojing, Y., & Sidney, W. (2008). The Platelet Release Reaction: Just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol*, 15 (5): 537-541.
- Raab, R., Daxecker, H., Edwards, R., Treumann, A., Murphy, D., & Moran, N. (2010). Protein interactions with the platelet integrin  $\alpha$ IIb regulatory motif. *Proteomics*, 10 (15): 2790–2800.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2 (8567): 1057-1058.
- Reed, G., Fitzgerald, M., & Polgar, J. (2000). Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secretory” life of thrombocytes. *Blood*, 96 (10): 3334-3342.
- Reed, G. L. (2007). Platelet Secretion. *Cardio Med Res*, 2 (15): 309-318.
- Rendu, F., & Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: Granules constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12 (5): 261-273.
- Rhee, J., Black, M., Schubert, U., Fischer, S., Morgenstern, E., & Hammes, H. (2004). The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost*, 92 (2): 394-402.
- Righetti, P., Castagna, A., Herbert, B., Reymond, F., & Rossier, J. (2003). Prefractionation techniques in proteome analysis. *Proteomics*, 3 (2): 1397-1407.
- Ronner, E., van Domburg, R. T., van den Brand, M. J., Feyter, P. J., Foley, D. P., van der Giessen, W. J., Serruys, P. W., & Simoons, M. L. (2002). Platelet GP IIb/IIIa receptor blockers for failed thrombolysis in acute myocardial infarction, alone or as adjunct to other rescue therapies. A single centre retrospective analysis of 548 consecutive patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 23 (19): 1529–1537.
- Rosa, J. P., George, J. N., & Bainton, D. F. (1987). Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membrane that can fuse with the cell surface. *J Clin Invest*, 80 (4): 1138-1146.
- Rozalski, M., Boncler, M., Luzak, B., & Watala, C. (2005). Genetic factors underlying differential blood platelet sensitivity to inhibitors. *Pharmacol Rep*, 57 (1): 1-13.
- Ruf, A., & Patsheke, H. (1995). Flow cytometric detection of activated platelets: Comparison of determining shape change, fibrinogen binding and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost*, 21 (2): 146-151.

- Ruggeri, Z., & Saldivar, E. (2003). Platelets, hemostasis and thrombosis. Von Willebrand factor and the mechanisms of platelet function. *J Thromb Haemost*, 1 (7): 1335-1342.
- Rybak, M., & Renzulli, L. (1989). Ligand Inhibition of the Platelet Glycoprotein IIb-IIIa Complex Function as a Calcium Channel in Liposomes. *J Biol Chem*, 264 (25): 14617-14620.
- Sanguhl, K., Shuldiner, A., Klein, T., & Atلمان, R. (2010). Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenetics Genom*, 1: 167-170.
- Sausville, E. A., & Holbeck, S. L. (2004). Transcription profiling of gene expression in drug discovery and development: the NCI experience. *Eur J Cancer*, 40 (17): 2544-2549.
- Schimitz, G., Rothe, G., Ruf, A., Barlage, S., Tshcope, D., & Clementson, K. (1998). European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for The Flow Citometric Characterization of Platelet Fuction. *Thromb Haemost*, 79 (5): 885-96.
- Schneider, D., Taatjes, D., & Sobel, B. (2000). Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of  $\alpha$ -granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb/IIIa. *Cardiovasc Res*, 45 (2): 437-446.
- Schrör, K., & Weber A. (2003). Comparative pharmacology of Gp IIb/IIIa antagonists. *J Thromb Thrombolysis*, 15 (2): 71-80.
- Shah, I., Shakeel, K., Malhotra, S., & Fischell, T. (2009). Eptifibatide: The evidence for its role in the management of acute coronary syndromes. *Core Evidence*, 4: 49-65.
- Shah, U., & Ma, A. (2007). Tests of platelet function. *Curr Opin Hematol*, 14: 432-437.
- Sharon, W., Gee, B., Rabiner, M., Reller, C., & Strehlow, A. (2004). Treatment & Recommendations for Homeless Patients with Cardiovascular Diseases. In: *Health Care for the Homeless Clinicians' Network*, pp. 23-25.
- Shattil, S. J., Cunningham, M., & Hoxie, J. A. (1987). Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 70 (1): 307-315.
- Shock, D. D., Kai, H. E., Wencel-Drake, J. D., & Parise, L. V. (1997). Ras activation in platelets after stimulation of the thrombin receptor, thromboxane A2 receptor or protein kinase C. *Biochem J*, 321 (2): 525-530.
- Simon, D., Kunicki, T., & Nugent, D. (2008). Platelet function defects. *Haemophilia*, 14: 1240-1249.
- Stahl, S. M. (1995). Platelets as pharmacologic models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. In: *The Platelets*. New York, Academic Press/Longnecker GL; pp. 308-340.
- Stein, M., Dong, J., & Wandinger-Ness, A. (2003). Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev*, 55 (11): 1421-1437.
- Steinhubl, S. R., Talley, J. D., & Braden, G. A. (2001). Point of care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 103 (21): 2572-2578.
- Tavassoli, M., & Aoki, M. (1989). Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells*, 15 (1): 3-14.

- Tocantins, L. M. (1938). The mammalian blood platelet in health and disease. *Medicine*, 17 (2): 155-260.
- Topol, E. J., Byzova, T. V., & Plow, E. F. (1999). Platelet GPIIb/IIIa blockers. *The Lancet*, 353 (98): 227-31.
- Ugarova, T. P., Budzynski, A. Z., Shatill, S. J. Ruggeri, Z. M., & Ginsberg, M. H. (1993). Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GpIIb/IIIa. *J Biol Chem*, 268 (28): 21080-7.
- Vahid, K., Vijayan, V., & Bray, P. (2007). Platelet Polymorphisms. *Platelet*, 2 (14): 281-307.
- Velculescu, V., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270 (5235): 484-487.
- VonHundelshausen, P., Peterson, F., & Brandt, E. (2007). Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost*, 97 (5): 704-713.
- Wagner, D. D., & Burger, P.C. (2003). Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (18): 2131-2137.
- Walter, D., Schachinger, V., Elsner, M., Dimmel, S., & Zeiher, A. (1997). Platelet glycoprotein III polymorphisms and the risk of coronary stent thrombosis. *Lancet*, 350 (9086): 1217-1219.
- Wang, L. (2004). Transcriptional down-regulation of the platelet ADP receptor P2Y(12) and clusterin in patients with systemic lupus erythematosus. *J Thromb Haemos*, 2 (8): 1436-1442.
- Weber, A., Jacobs, C., Meila, D., Weber, S., Zotz, R., Scharf, R., & Kelm, M. (2002). No evidence for an influence of the human platelet antigen-1 polymorphism on the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Pharmacogenetics*, 12 (7): 581-583.
- Weiss, E., Bray, P., & Tayback M. (1996). A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*, 334 (17): 1090-1094.
- Wheeler, G. L., Braden, G. A., & Bray, P. F. (2002). Reduced inhibition by abciximab in platelets with PI<sup>A2</sup> polymorphism. *Am Heart J*, 143 (1): 76-82.
- White, J. G. (1971). Platelet morphology. In: *The Circulating Platelet*. New York: Academic Press, pp. 45-121.
- White, J. G. (1976). Platelet ultrastructure. In: *Haemostasis and thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 20-46.
- White, J. (2006). Views of the Platelet Cytoskeleton at Rest and at Work. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 509: 156-176.
- Zhenyu, L., Guoying, Z., Jasna, A., Changgeng, R., & Xiaoping, D. (2004). A Platelet Secretion Pathway Mediated by cGMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem*, 279 (41): 42469-42475.





## VIII. ANEXOS

**Tabela 8.1.** Proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por SDS-PAGE-MS/MS (para um *protein score* C/% superior a 95%).

Banda	Nome	Nº de Acesso	PM	pI	Nº Péptidos	<i>Protein Score</i>	Localização Celular	GOA Processo Biológico
1, 5, 6, 8, 13, 16*, 27, 30, 40, 52, 53	Albumina sérica	P02768	69321,49	5,92	7	86,30	Espaço extracelular	Transporte/Regulação de processos biológicos
8	Factor 2 de crescimento/diferenciação	Q9UK05	47290,64	6,03	9	56,40	Espaço extracelular	Diferenciação celular/Regulação de processos biológicos
10*	Plasminogénio	P00747	90510,15	7,04	8	96,90	Secretada	Diferenciação celular/Regulação de processos biológicos
12	Apolipoproteína A-I	P02647	30758,93	5,56	8	59	Membrana/Secretada	Transporte/Processos metabólicos
	Factor do complemento: C4-A	P0C0L4	192650,45	6,65	7	107	Secretada	Processos metabólicos
18, 41*	Fibrinogénio, cadeia <i>beta</i>	P02675	55892,26	8,54	18	176	Membrana/Secretada	Processos celulares/ Secreção
19, 42	Fibrinogénio, cadeia <i>gamma</i>	P02679	51478,87	5,37	8	96,80	Membrana/Secretada	Resposta a estímulos
20, 22, 33, 43*, 44, 46	Actina citoplasmática 2	P63261	41765,79	5,31	8	133	Citoplasma	Mobilidade celular
20*, 21, 22, 43, 44, 45	<i>alpha</i> -actina	P68133	42023,85	5,23	6	115	Citoplasma	Biossíntese
20, 21	<i>beta</i> -actina ligação à proteína 3	Q9BYX7	41988,83	5,91	4	99,90	Espaço extracelular	Mobilidade celular
20, 21, 42, 43, 44	POTE anquirina, membro do domínio da família F	A5A3E0	121366,69	5,83	8	97,60	Citoplasma	Mobilidade celular
	POTE anquirina, membro do domínio da família E	Q6S8J3	121285,65	5,83	7	93,10	Citoplasma	Mobilidade celular
22	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase	P04406	36030,40	8,57	8	91	Membrana/Citoplasma	Processos metabólicos
23	14-3-3 proteína <i>zeta/delta</i>	P63104	27727,73	4,73	10	113	Citoplasma	Morte celular

24	Uncharacterized protein C2orf77	Q0VFZ6	65711,22	9,03	17	53,5	—	Desconhecida
24, 45*, 48	Tropomiosina, cadeia <i>alpha</i> -4	P67936	28504,49	4,67	11	119	Citoplasma	Mobilidade celular
	Tropomiosina, cadeia <i>beta</i>	P07951	32830,57	4,66	13	119	Citoplasma	Processos metabólicos
24, 47	Tropomiosina, cadeia <i>alpha</i> -3	P06753	32798,74	4,68	11	82,30	Citoplasma	Processos metabólicos
	Tropomiosina, cadeia <i>alpha</i> -1	P09493	32688,68	4,69	9	54,60	Citoplasma	Mobilidade celular/ Processos celulares
27*	Ig, cadeia <i>kappa</i> , região V-III Ti	P01622	14062,05	7,74	1	132	Espaço extracelular	Processos celulares
32	Ig cadeia <i>kappa</i> , região C	P01834	11627,77	9,34	1	116	Espaço extracelular	Processos celulares
32*	Trombospondina-1	P07996	129299,55	4,71	23	143	Espaço extracelular	Morte celular/Mobilidade celular/ Processos metabólicos
33*	Vinculina	P18206	123721,81	5,5	4	99,40	Membrana/ Citoplasma	Mobilidade celular/ Processos celulares
34*	Actina- <i>alpha</i> 1	P12814	102992,63	5,25	12	124	Citoplasma	Mobilidade celular/ Morte celular/ Processos celulares
34	Actina- <i>alpha</i> 4	O43707	104788,47	5,27	7	68,30	Citoplasma	Transporte/Mobilidade celular/ Morte celular
35	Gelsolina	P06396	85644,19	5,9	14	99,20	Citoplasma/ Secretada	Regulação de processos biológicos
	Proteína 6 de ligação-retinoblastoma	Q7Z6E9	201441,70	9,65	21	54,10	Núcleo	Regulação de processos biológicos
36	Factor XIII da coagulação, cadeia A	P00488	83214,60	5,75	15	129	Citoplasma/ Secretada	Processos metabólicos
43*, 44, 45	Actina aórtica do músculo liso,	P62736	41981,80	5,23	10	137	Citoplasma	Resposta a estímulos
45	Cadeia- <i>alpha</i> do fibrinogénio	P02671	94914,41	5,7	9	54,80	Secretada	Resposta a estímulos
53	Ig, cadeia <i>alpha</i> -1, região C	P01876	37630,64	6,08	5	91,40	Espaço extracelular	Processos metabólicos
	Ig, cadeia <i>alpha</i> -2, região C	P01877	36503,01	5,71	4	85,10	Espaço extracelular	Processos metabólicos

**Legenda:** PM – peso molecular; pI – ponto isoelétrico; (\*) N° da banda do gel onde a proteína identificada se encontra intacta.

**Tabela 8.2.** Proteínas libertadas pelas plaquetas após a estimulação com trombina 0,5 U/mL, identificadas por 2D-PAGE-MS/MS (para um *protein score* C/% superior a 95%).

Spot	Nome	Nº de Acesso	PM	pI	Nº Péptidos	Protein Score	Localização Celular	GOA Processo Biológico
1, 17	Proteína de ligação ao factor beta de transformação do crescimento latente	Q14766	186672,54	5,63	25	263	Secretada/ Espaço extracelular	Processos celulares
2, 4, 14, 39	Domínio de repetição LEM da anquirina	Q86XL3	104049,66	6,66	17	63,80	Membrana	Mobilidade celular
2, 4*, 5, 6, 12, 14	Trombospondina-1	P07996	129299,55	4,71	23	143	Espaço extracelular	Morte celular/Mobilidade celular/ Processos metabólicos
8	Lisozima C	P61626	16526,28	9,38	8	117	Espaço extracelular	Morte celular/ Processos metabólicos
11, 118, 138, 175, 179	Proteína 4 rica em prolina	Q16378	15115,64	6,97	3	52,40	Secretada/ Espaço extracelular	Resposta a estímulos
17	Calmodulina	P62158	16826,83	4,09	4	191	Citoplasma	Processos metabólicos/ Resposta a estímulos
17	P-selectina	P16109	90773,23	6,17	11	109	Membrana	Processos celulares/Regulação de processos biológicos
17, 20, 33, 34*	Proteína beta (A4) - Amilóide	P05067	86888,05	4,73	20	376	Membrana	Diferenciação celular/ Morte celular/ Processos metabólicos
18*	Nidogénio-1	P14543	136290,7	5,12	18	204	Membrana/ Secretada/Espaço extracelular	Processos celulares
23*	Integrina <i>alpha</i> -IIb	P08514	113305,5	5,21	5	62,30	Membrana	Regulação de processos biológicos
25, 36*, 46, 134, 167	POTE anquirina, membro do domínio da família F	A5A3E0	121366,69	5,83	8	108	Citoplasma	Mobilidade celular
25, 36*, 134, 208	POTE anquirina, membro do domínio da família E	Q6S8J3	121285,7	5,83	10	189	Citoplasma	Mobilidade celular
26, 27, 28, 47	Talina-1	Q9Y490	269599	5,77	23	253	Citoplasma/ Membrana	Processos celulares/ Mobilidade celular
28, 39, 89	Fibrinogénio, cadeia <i>gamma</i>	P02679	51478,87	5,37	8	181	Membrana/ Secretada	Resposta a estímulos
30*	Vinculina	P18206	123721,81	5,5	4	57,90	Membrana/ Citoplasma	Mobilidade celular/ Processos celulares

35*	Endoplasmina	P14625	92411,34	4,76	7	58,20	Citoplasma	Regulação de processos biológicos / Transporte
35, 39	Factor de von Willebrand	P04275	309055,9	5,3	15	89,5	Secretada/ Espaço extracelular	Processos celulares/ Processos metabólicos
36	<i>gamma</i> -actina	P63267	41849,79	5,31	2	95,70	Citoplasma	Mobilidade Celular
37*	Actinina- <i>alpha</i> 1	P12814	102992,63	5,25	12	124	Citoplasma	Mobilidade celular/ Morte celular/ Processos celulares
	Actinina- <i>alpha</i> 4	O43707	104788,47	5,27	7	68,30	Citoplasma	Transporte/Mobilidade celular/ Morte celular
42	Fosfoglicerato quinase 1	P00558	44586,13	8,3	7	80,3	Citoplasma	Processos metabólicos
45, 46, 47*	Gelsolina	P06396	85644,19	5,9	14	158	Citoplasma/ Secretada	Regulação de processos biológicos
49, 50	Glicoproteína <i>alpha</i> -1B	P04217	54238,58	5,58	11	106	Espaço Extracelular	Processos celulares
49, 52*, 54, 56	Transferrina sérica	P02787	76999,61	6,81	5	152	Secretada	Transporte/ Processos metabólicos
49, 91	Domínio SNW da proteína-1	Q13573	61456,48	9,53	14	58,60	Núcleo	Regulação de processos biológicos / Biossíntese
50	Ubinucleína-2	Q6ZU65	145998,23	9,24	17	56,40	Citoplasma	Regulação de processos biológicos
57, 61-65*, 72, 79, 88	Albumina sérica	P02768	69321,49	5,92	16	105	Espaço Extracelular	Transporte/ Regulação de processos biológicos
68	Proteínas séricas <i>deprivation-response</i>	O95810	47144,59	5,14	12	129	Membrana/ Citoplasma	Diferenciação celular/ Processos celulares
	Vitronectina	P04004	54271,17	5,55	6	77,10	Secretada/ Espaço extracelular	Processos celulares
69*, 78	Proteína dissulfeto-isomerase	P07237	57080,67	4,76	13	428	Membrana	Processos metabólicos
69-71	Antitripsina- <i>alpha</i> 1	P01009	46707,02	5,37	19	498	Secretada/ Espaço extracelular	Processos metabólicos
70	Coactosina	Q14019	15935,03	5,54	5	187	Citoplasma	Mobilidade celular
70, 71	Carnitina O-palmitoil transferase 2	P23786	46707,10	5,37	18	481	Citoplasma	Processos metabólicos/ Transporte
71	Proteína centrossomal 170 kDa	Q5SW79	175186,76	6,64	21	57,60	Citoplasma	Mobilidade Celular
78*	Proteína dissulfeto-isomerase A3	P30101	56746,75	5,98	21	338	Citoplasma	Processos metabólicos

79-82*, 92, 94	Fibrinogénio, cadeia <i>beta</i>	P02675	55892,26	8,54	18	176	Processos celulares/ Secreção
	Ig, cadeia <i>gamma</i> -3, região C	P01860	41260,36	8,23	4	79,90	Membrana/ Secretada
81	Ig, cadeia <i>gamma</i> -2, região C	P01859	35877,76	7,66	3	75,40	Secretada/ Espaço extracelular/ Membrana
	Ig, cadeia <i>gamma</i> -4, região C	P01861	35917,86	7,18	1	66,5	Regulação de processos biológicos
85	Glutamina S-transferase	P09211	23341,02	5,43	3	58	Regulação de processos biológicos
89	Subunidade <i>alpha</i> -1 da F-actina- <i>capping</i>	P52907	32902,33	5,45	3	168	Mobilidade celular
95*, 96	<i>alpha</i> -enolase	P06733	47139,32	7,01	16	378	Regulação de processos biológicos / Diferenciação celular
95, 96	<i>gamma</i> -enolase	P09104	47239	4,91	7	169	Processos metabólicos
95, 96*	<i>beta</i> -enolase	P13929	46902,28	7,59	5	157	Processos metabólicos
98, 105, 107	Transgelina-2	P37802	22377,17	8,41	12	223	Diferenciação celular
100, 101	Apolipoproteína A-I	P02647	30758,93	5,56	8	59	Transporte/Processos metabólicos
102, 107, 114, 116, 159, 160*, 164, 165	Proteína básica das plaquetas	P02775	13885,42	9,04	2	146	Diferenciação celular/ Regulação de processos biológicos
104	Fibrinogénio, cadeia <i>alpha</i>	P02671	94914,41	5,7	4	70,5	Transporte/Processos metabólicos /Regulação de processos biológicos
105, 107	Proteína <i>Zinc finger</i>	Q96MX3	67790,05	9,51	13	65,10	Regulação de processos biológicos
107	Transgelina-3	Q9UI15	22458,14	6,84	12	71,90	Diferenciação celular
107, 114, 115, 128, 151, 161	Proteína 3 rica em cisteína	Q6Q6R5	24071,35	8,98	4	56,20	Transporte
111	Galectina	Q3ZCW2	18973,65	5,12	5	306	Processos celulares
112	<i>Ras-related</i> Proteína Rap-1b	P61224	20811,59	5,65	10	233	Processos celulares
116, 144	<i>Ras-related</i> Proteína Rap-1A	P62834	20973,71	6,38	9	218	Processos celulares
	Factor plaquetário 4	P02776	10837,89	8,93	4	112	Processos metabólicos/ Morte celular
116, 151	Variante do factor plaquetário 4	P10720	11545,28	9,3	4	104	Regulação de processos biológicos

117	Proteína intracelular - canais de cloreto	O00299	26905,75	5,09	11	303	Processos metabólicos / Transporte
131, 132, 178*	Polipeptídeo 6 da miosina	P60660	16919,13	4,56	5	72,30	Mobilidade celular
138*	Transstretina	P02766	15877,05	5,52	13	307	Transporte
145, 150, 165	Hemoglobina, subunidade- <i>alpha</i>	P69905	15247,93	8,72	5	241	Transporte
145, 151, 160-167, 171*	Hemoglobina, subunidade- <i>beta</i>	P68871	15988,29	6,75	9	193	Transporte/ Biossíntese
145, 162-164, 171	Hemoglobina, subunidade- <i>delta</i>	P02042	16045,29	7,85	5	78,30	Transporte
150	Miotrofina	P58546	12886,60	5,27	3	65	Diferenciação celular/ Biossíntese
151	Domínio de ligação da proteína rica em ácido glutâmico SH3	O75368	12766,38	5,22	9	173	Processos celulares
162-164	Hemoglobina, subunidade- <i>gamma1</i>	P69891	16130,31	6,64	4	68,69	Transporte
167, 198, 208	<i>alpha</i> - actina	P68032	41981,80	5,23	10	186	Resposta a estímulos/ Morte celular/ Mobilidade celular/ Diferenciação celular/ Biossíntese
196, 198, 208	SPARC	P09486	34609,71	4,73	11	293	Diferenciação celular/ Processos celulares
198, 208	Actina citoplasmática 2	P63261	41765,79	5,31	8	107	Mobilidade celular
266	Actina citoplasmática 1	P60709	41709,73	5,29	5	115	Mobilidade celular
266	Peroxiredoxina-2	P32119	21878,24	5,66	2	78,40	Processos metabólicos/ Morte celular
277	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase	P04406	36030,40	8,57	8	91	Processos metabólicos

**Legenda:** PM – peso molecular; pl – ponto isoeletrico; (\*) *Spot* do gel onde a proteína identificada se encontra intacta.