



Espécies reativas de oxigênio medeiam a hiper-reatividade plaquetária induzida pelo colágeno oxidado

Palavras-Chave: AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA, DOENÇA CARDIOVASCULAR, ESTRESSE OXIDATIVO

Autores:

Mayara Grazielly Brito Rocio, FCF – UNICAMP

Felipe Caliani Mathias Netto, FCM - UNICAMP

Beatriz Scardua Silva , FCF - UNICAMP

Tatiana Alves Toledo, FCM - UNICAMP

Prof. Dr. Renato Simões Gaspar (orientador), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) leva à oxidação de proteínas que gera danos presentes em doenças crônicas, como doenças cardiovasculares. Um importante componente da doença cardiovascular associado à produção exacerbada de ROS é a hiperativada plaquetária, encontrada em pacientes com fatores de risco para eventos isquêmicos. Plaquetas são importantes para prevenir o sangramento excessivo, no entanto, quando hiperativadas podem levar à formação de trombos. Um importante agonista plaquetário, presente no subendotélio vascular e pertinente para doenças cardiovasculares é o colágeno, que possui uma meia-vida longa. Embora a maioria das proteínas tenha uma meia-vida curta (dias a semanas), o colágeno fibrilar tipo I, encontrado no subendotélio de artérias, tem meia-vida de mais de 10 anos. Nesse sentido, acredita-se que o colágeno vascular seja oxidado ao longo do tempo e esteja presente artérias de pacientes com doença cardiovascular. Assim, é razoável especular que o colágeno oxidado favorece a agregação plaquetária e consequentemente a formação de trombos e disfunção endotelial.

METODOLOGIA

Oxidação do colágeno:

Colágeno tipo 1 bovino foi dissolvido em ácido acético 0,02% e incubado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas proporções colágeno:peróxido de 0:0. 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, 1:10000 a 4º por pelo menos 12 horas.

Obtenção das plaquetas:

Os ensaios foram realizados utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) e plaquetas lavadas (PL). Para a obtenção destas plaquetas, foram coletados até 20 mL de sangue de

voluntários sadios que não fizeram uso de medicações antiplaquetárias por pelo menos 14 dias anteriores ao experimento. O sangue foi coletado em citrato de sódio 2.8%, numa proporção de 1:9 v/v. Para a obtenção de PRP, o sangue foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos. Para a preparação de PL, uma solução de citrato de sódio com dextrose (ACD, 1:9 v/v) foi adicionada ao PRP e este foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos para a formação do pellet de plaquetas. O sobrenadante foi descartado e as plaquetas ressuspensas em tampão de Tyrode's (NaCl 134 mM; KCl 2.9 mM; MgCl 2 1.00 mM; Na 2 HPO 4 0.341 mM, NaHCO₃ 12 mM, HEPES 20 mM e D-Glucose 5.5 mM, pH 7.4) em quantidade suficiente para que a concentração estivesse na faixa de 2.5×10^8 plaquetas por mL (número de aprovação no comitê de ética: CAAE 77219624.5.0000.5404).

Agregação plaquetária:

Ensaio de agregação plaquetária foram realizados na presença de inibidores seletivos de: ciclooxygenases (ácido acetilsalicílico, AAS),, NADPH oxidases 1/4 (GKT137831), além de quelantes de superóxido (tiron) e peróxido de hidrogênio (catalase). Os antagonistas foram incubados no PRP por 10 minutos em diferentes concentrações. Após o período de incubação dos inibidores, o ensaio de agregação foi feito com o colágeno padrão e o colágeno oxidado para verificar o impacto de tais vias na resposta ao colágeno oxidado.

Mensuração de espécies reativas de oxigênio:

Na análise de produções de espécies reativas de oxigênio (EROS) por fluorometria, foram adicionados 10 µg/mL de colágeno controle ou oxidado em poços de uma placa de 96 poços. PL foram incubadas por 15 min com DCFDA, que é uma sonda que emite fluorescência quando oxidada.. Após o período de incubação, 100 µL de PL foram adicionados aos poços. Em alguns poços omitimos os colágenos (PL em repouso) e noutros omitimos as PL (para determinar se o colágeno oxidado era, por si só, capaz de oxidar a sonda). Fluorescência (ex/em 485/535 nm) foi lida a cada 5 minutos durante uma hora em um fluorímetro (BioTek, Agilent).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar a influência da oxidação do colágeno na ativação plaquetária, inicialmente avaliamos os efeitos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre a capacidade agregante do colágeno. Observamos que a adição concomitante de H₂O₂ ao colágeno não resultou em um aumento na agregação plaquetária, porém quando a incubação ocorreu ao longo de 12 horas, vimos que plaquetas estimuladas com colágeno oxidado agregam expressivamente mais do que aquelas estimuladas com colágeno controle. Esses dados sugerem que, quando o colágeno permanece exposto por mais tempo ao agente oxidante, ele sofre alterações estruturais que aumentam sua capacidade de ativar plaquetas e induzir a agregação.

A hiper-reatividade plaquetária induzida por colágeno oxidado pode contribuir diretamente para a formação de trombos arteriais, especialmente em pacientes com risco aumentado para eventos isquêmicos, nos quais a produção de ROS encontra-se exacerbada. A ativação plaquetária tem papel central na trombose arterial, sendo, inclusive, alvo de intervenções farmacológicas com antiagregantes plaquetários. Sabe-se que esse processo é direcionado por diferentes vias de sinalização, que podem ser moduladas em situações de estresse oxidativo (Marja. K. Puuruenem et al, 2018).

Em seguida, avaliamos a agregação plaquetária na presença de ácido acetilsalicílico (AAS), um inibidor da enzima ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de tromboxano A_2 (TXA₂). Nossos resultados corroboram uma menor sensibilidade das plaquetas ao bloqueio da via da COX quando estas foram estimuladas com colágeno oxidado. Este achado sugere que o colágeno oxidado pode acionar vias alternativas de ativação ou amplificar a sinalização de forma a superar o efeito inibitório do AAS.

Além disso, medimos a produção intracelular de ROS com ensaios de fluorimetria utilizando a sonda DCFDA, que se torna fluorescente na presença dessas espécies reativas de oxigênio. A fluorescência foi detectada na presença e ausência de plaquetas, o que nos possibilitou observar que as plaquetas são as principais fontes de ROS em resposta ao colágeno oxidado.

A partir destes resultados investigamos a contribuição de diferentes ROS à perda de sensibilidade ao AAS em plaquetas estimuladas com colágeno oxidado. Utilizamos inicialmente o inibidor de NADPH oxidases 1 e 4, o GKT137831. Não foram observadas alterações significativas na agregação induzida pelo colágeno oxidado ou controle na presença do inibidor, sugerindo que essa enzima não desempenha papel central em nossos achados.

Em seguida utilizamos Tiron, um sequestrador de $O_2^{\cdot-}$. A co-inibição com AAS e Tiron não foi capaz de potencializar o efeito do AAS isoladamente na agregação plaquetária induzida pelo colágeno oxidado, reforçando que o $O_2^{\cdot-}$ não está envolvido na perda de sensibilidade ao AAS.

Por outro lado, a co-inibição com AAS e catalase, que é uma enzima que decompõe H_2O_2 , potencializou o efeito inibitório em plaquetas estimuladas com colágeno oxidado, quando comparada à condição contendo apenas AAS. Isso indica que o H_2O_2 é um mediador-chave da resposta hiper-reativa desencadeada pelo colágeno oxidado em plaquetas.

CONCLUSÃO

Em conjunto, esses dados indicam que a oxidação do colágeno amplifica sua capacidade de ativar as plaquetas, promovendo a produção exacerbada de H_2O_2 , o que pode contribuir para a hiper-reatividade plaquetária observada em contextos de estresse oxidativo, como nas doenças cardiovasculares. Esses achados sugerem que o controle da produção de ROS pode representar uma estratégia terapêutica promissora para prevenir eventos trombóticos associados a alterações oxidativas na matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; **60**: 1–4.

Puurunen MK, Hwang S, Larson MG, Vasan RS, O'Donnell CJ, Tofler G, Johnson AD. ADP Platelet Hyperreactivity Predicts Cardiovascular Disease in the FHS (Framingham Heart Study). *JAHA* 2018; **7**: e008522.

Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2016; **14**: 918–30.

Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 1989; **264**: 7576–83.

Zapp C, Obarska-Kosinska A, Rennekamp B, Kurth M, Hudson DM, Mercadante D, Barayeu U, Dick TP, Denysenkov V, Prisner T, Bennati M, Daday C, Kappl R, Gräter F. Mechanoradicals in tensed tendon collagen as a source of oxidative stress. *Nat Commun* 2020; **11**: 2315.

Gaspar RS, da Silva SA, Stapleton J, Fontelles JL de L, Sousa HR, Chagas VT, Alsufyani S, Trostchansky A, Gibbins JM, Paes AM de A. Myricetin, the Main Flavonoid in *Syzygium cumini* Leaf, Is a Novel Inhibitor of Platelet Thiol Isomerases PDI and ERp5. *Front Pharmacol* 2020; **10**: 1678.

Gaspar RS, Sage T, Little G, Kriek N, Pula G, Gibbins JM. Protein Disulphide Isomerase and NADPH Oxidase 1 Cooperate to Control Platelet Function and Are Associated with Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Antioxidants* 2021; **10**: 497.