

Karina Teixeira Dias

Efeito do tratamento com ATB-346, um doador híbrido de H₂S em modelo experimental de trombose induzida em vasos sanguíneos cerebrais de camundongos

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Versão corrigida, a versão original se encontra disponível na Unidade do programa.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Stephen Fernandes de Paula Rodrigues

São Paulo

2024

Resumo

A coagulação é um processo fisiológico necessário frente a situações que podem causar danos ao indivíduo. É necessário que este processo seja cuidadosamente regulado para evitar a formação exagerada de trombos. A trombose é uma das principais causas de mortalidade e morbidade ao redor do mundo. Medicamentos antitrombóticos são eficazes, todavia, o principal efeito colateral é a hemorragia, que pode ser fatal, sendo necessário o desenvolvimento de novos medicamentos com perfil de ação mais seguro. O ATB-346 é um doador de H₂S acoplado ao naproxeno que reduz rapidamente e de forma prolongada a atividade da COX, sem causar reações adversas gastrintestinais. Apesar dos processos inflamatórios e trombóticos compartilharem pontos de ativação em comum, não se sabe se o ATB-346 exerce ação protetora vascular na trombose. Para verificar esta hipótese, utilizamos camundongos machos C57BL/6 e vasos piais cerebrais, em que trombos foram induzidos *in vivo* e *in situ* pela ação de luz e do corante fluoresceína (FITC) e observados por microscopia intravital. Como controles, os animais foram tratados com naproxeno, tiobenzamida (TBZ) - porção doadora de H₂S do ATB-346, em doses equimolares, veículo (solução de dimetilsulfóxido – DMSO – em carboximetilcelulose – CMC) ou salina 0,9%. Foram medidas espécies reativas de oxigênio (EROs) na região do trombo, *in vivo*, as expressões de fibrinogênio hepático por reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real, os tempos de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (TTPa) e a concentração circulante de fibrinogênio por kits comerciais, contagem plaquetária, as concentrações de malondialdeído (MDA), interleucina 1 β (IL-1 β), tromboxano B2 (TXB2) no cérebro por ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA), concentração plasmática de H₂S por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise macroscópica gástrica. Observamos que animais tratados com ATB-346 mostraram aumento nos tempos de início de formação de trombo e de oclusão total do vaso após indução do trombo, diminuição na expressão de fibrinogênio hepático e redução na concentração plasmática de H₂S, por efeito sinérgico do naproxeno e TBZ. Assim, concluímos que o ATB-346 é efetivo para retardar a formação de trombos no cérebro de camundongos por atuar reduzindo as concentrações plasmáticas de H₂S e a expressão hepática de fibrinogênio.

Palavras-chave: Gasotransmissor, trombose, camundongos, cérebro, fibrinogênio.

ABSTRACT

Coagulation is a necessary physiological process in situations that can put the individual in danger. This process needs to be carefully balanced to avoid disseminated thrombus formation. Thrombosis is one of the main causes of mortality and morbidity worldwide. Antithrombotic drugs are effective, however, the main side effect is hemorrhage, which can be fatal. Therefore, it is necessary to discover safer antithrombotic drugs. ATB-346 is an H₂S donor coupled to naproxen that longer and rapidly reduces the activity of COX, with no concomitant gastrointestinal side effects. However, despite of inflammation and coagulation share common activation steps, it is not known whether these H₂S donor exert any vascular protective action on thrombus formation. To verify this hypothesis, we used male C57BL/6 mice and pial cerebral vessels, in which thrombi were induced *in vivo* and *in situ* by the action of light and fluorescein dye (FITC) and observed by intravital microscopy. As controls, equimolar naproxen or thiobenzamide – the H₂S donor part of ATB-346 – alone, as well as vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO in carboxymethylcellulose, CMC), or 0.9 % saline. Reactive oxygen species (ROS) were measured in the region of the thrombus, *in vivo*, hepatic fibrinogen expressions by real-time polymerase chain reaction (PCR), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT) and fibrinogen circulating concentration, all measured using commercial kits, platelet count, malondialdehyde (MDA), interleukin 1 β (IL-1 β), thromboxane B₂ (TXB₂) concentrations in the brain by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), plasma H₂S concentration by high-performance liquid chromatography (HPLC), and gastric macroscopic analysis. We observed that animals treated with ATB-346 showed an increase in the time to initial thrombus formation and total vessel occlusion after thrombus induction, decrease hepatic fibrinogen expression and a reduction in plasma H₂S concentration, due to the synergistic effect of naproxen and TBZ. Thus, we conclude that ATB-346 is effective in delaying the formation of thrombus in the brain of mice by reducing plasma H₂S concentration and hepatic fibrinogen expression.

Keywords: Gasotransmitter, thrombosis, mice, brain, fibrinogen.

Introdução

Hemostasia

Os vasos sanguíneos presentes em organismos vivos permitem a circulação de células sanguíneas e fluido que garantem a vigilância imunológica, o fornecimento de oxigênio e nutrientes e a eliminação de resíduos (CARMELIET; JAIN, 2011).

Estes vasos são revestidos por uma monocamada interna de células endoteliais que sintetizam e liberam ativadores e inibidores da agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (ARNOUT *et al.*, 2006).

Frente a estímulos lesivos, que levam à injúria do endotélio dos vasos e exposição da matriz subendotelial, plaquetas circulantes aderem entre si a partir da interação de moléculas como fibras de colágeno, trombina e o fator de Von Willebrand (vWF) com receptores plaquetários, para impedir o extravasamento sanguíneo (ARNOUT *et al.*, 2006, GOTO *et al.*, 2015). Este processo é conhecido como hemostasia e apresenta três fases: hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise (GRESELE *et al.*, 2008).

A hemostasia primária ocorre logo após a lesão vascular, com a exposição da camada subendotelial. Após a lesão, o músculo liso que envolve o vaso se contrai, levando à vasoconstrição. Esta ação tem como objetivo minimizar a perda de sangue e aproximar as plaquetas circulantes do local lesionado (CASEY, 2003; GRESELE *et al.*, 2008). O processo de adesão é iniciado com a interação entre o colágeno subendotelial e a glicoproteína plaquetária VI (GPVI) e ligação entre o complexo glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) ao vWF e à integrina leucocitária $\alpha M\beta 2$ e à P-selectina. Essas ligações induzem o aumento da expressão de integrinas plaquetárias, incluindo integrinas $\alpha 2\beta 1$, que também se ligam ao colágeno, e integrinas $\alpha IIb\beta 3$ que se ligam ao fibrinogênio ou ao vWF, participando da agregação plaquetária (SCHARF, 2018; ZHANG *et al.*, 2022).

Quando as plaquetas estão aderidas, a ação de agonistas plaquetários, como colágeno, trombina e epinefrina dão início à ativação plaquetária à partir da ativação de diversas cascatas bioquímicas no citosol.

Uma importante cascata é iniciada pelo estímulo da fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol 3'4' difosfato (PIP₂), forma o inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga a receptores do sistema tubular denso - principal sítio de armazenamento de cálcio (Ca²⁺) - induzindo o efluxo e elevando a concentração de

íons cálcio no citosol. Uma vez no citosol, os íons cálcio promovem a liberação de grânulos intracelulares, além de se associar à calmodulina, induzindo o rearranjo na estrutura do citoesqueleto da plaqueta, mudando sua conformação, de discos lisos para esferas espinhosas (CASEY, 2003; VANNI, 2007; GRESELE *et al.*, 2008).

O DAG é responsável pela ativação da proteinoquinase C (PKC) que, assim como o IP3, promove a liberação de componentes dos grânulos intracelulares e induzem a ativação do receptor de membrana glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa).

Existem dois tipos de grânulos plaquetários: os grânulos alfa, que são vWF, trombospondina, plasminogênio, fibronectina e P-selectina. Estes, quando liberados, aumentam os processos adesivos e promovem interação entre as células. Já os grânulos densos, são serotonina e adenina difosfato (ADP), estes promovem o recrutamento de plaquetas, para que o tampão plaquetário aumente via interação ligante-receptor específico na superfície plaquetária.

O ADP liberado se liga ao receptor purinérgico plaquetário e, assim, participa da ativação da cascata de proteinoquinase de ativação mitogênica (MAP quinase), estimulando a fosfolipase A2 (PLA2), que hidrolisa a fosfatidilcolina (FC), causando a liberação do ácido araquidônico (AA), que por via ação da ciclooxigenase (COX) tem como produto o tromboxano A2 (TXA2), que atua como potente agonista plaquetário ligando-se a receptores plaquetários (TPs) e atuando como vasoconstritor (VANNI, 2007; GRESELE *et al.*, 2008).

Quando o receptor GPIIb/IIIa é ativado pela ação de grânulos plaquetários, ele muda sua conformação e passa a interagir fortemente com o fibrinogênio solúvel presente no plasma, assim ele medeia o processo de agregação e a formação do tampão plaquetário (VANNI, 2007; GRESELE *et al.*, 2008) (**Figura 1**).

A quantidade de trombina secretada na fase de iniciação amplifica o processo da coagulação, causando ativação de mais plaquetas, aumentando a adesão plaquetária e ativando os fatores V em fator Va e o fator XI em fator XIa. O vWF é lisado pela trombina e libera o fator VIIIa. Sendo assim, na fase de amplificação temos a formação dos fatores ativados Va, VIIIa e IXa na superfície de plaquetas ativadas.

A última fase da hemostasia secundária, conhecida como fase de propagação, tem como característica a produção de complexos tenases e protrombinases. O complexo tenase é formado quando o fator IXa se desloca da célula responsável pela liberação de FT e liga-se ao seu receptor em plaquetas ativadas. O complexo tenase (fator VIIIa/IXa) ativa o fator X, que junto com o fator Va formam o complexo protrombinase (fator Xa/fator Va). O complexo protrombinase é responsável por aumentar a produção de trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina e ativa o fator estabilizador da fibrina (fator XIII) para formar o tampão de fibrina (CAGNOLATI, 2017).

E a última fase da hemostasia é a fibrinólise. Nesta etapa, após o tamponamento do vaso sanguíneo pela rede de fibrina e plaquetas, as células endoteliais liberam o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), responsável pela conversão do plasminogênio em plasmina, sendo a plasmina a responsável pela degradação da rede de fibrina, formando D-dímeros (TERUYA, 2021).

Trombose

O processo de coagulação é quase instantâneo, entretanto é necessário que seja cuidadosamente regulado para evitar a formação indesejada de trombos, conhecida como trombose, que pode comprometer o fornecimento de oxigênio e nutrientes para um determinado órgão, levando a sintomas indesejados, podendo inclusive ser fatal. Para evitar isto, o endotélio vascular atua como uma superfície antitrombótica (NORRIS, 2003).

A trombose é a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo. De fato, em 2010, uma em cada quatro mortes no mundo ocorreu em decorrência de processos tromboembólicos (WENDELBOE; RASKOB, 2016). Além disso, dentre os sobreviventes, aproximadamente um terço passa a viver com sequelas decorrentes das situações clínicas advindas da formação indevida de trombos, são elas: o acidente vascular encefálico (AVE), com conseqüente paralisia de membros, perda de sensibilidade em regiões do corpo, dificuldade para falar e/ou comer; o infarto agudo

do miocárdio (IAM), que pode levar à insuficiência e/ou arritmias cardíacas; úlceras venosas, comumente associadas à dor, edema, e eritema; e o embolismo pulmonar, caracterizada por manifestações como dificuldade para respirar ou dor no peito.

Foi descrita pela primeira vez por Rudolph Virchow, no século 19, a relação entre os três fatores principais que contribuem para o desenvolvimento da trombose, são eles: a estase do fluxo sanguíneo, o dano à parede endotelial e a hipercoagulabilidade. A partir desta pesquisa inicial, a fisiopatologia da trombose foi extensamente estudada, a fim de melhor compreender a relação entre as plaquetas, os fatores de coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico (SARVANANTHAN; DAS, 2012).

A trombose pode acontecer na circulação arterial ou venosa. A trombose arterial é a causa da maioria dos casos de IAM e responsável por cerca de 80% dos casos de AVE, enquanto o tromboembolismo venoso é a terceira principal causa de morte associada a doenças cardiovasculares (MACKMAN, 2008).

A principal causa da trombose arterial é a quebra de placa aterosclerótica – acúmulo de células lipídicas, inflamatórias, musculares e constituintes da matriz extracelular na parede arterial. A ruptura de uma placa aterosclerótica causa danos no endotélio vascular e liberação de constituintes da placa no lúmen do vaso sanguíneo e conseqüentemente, induz o processo de coagulação (MACKMAN, 2008) **(Figura 2)**.

A trombose venosa profunda (TVP), por sua vez, ocorre com frequência em grandes veias de membros inferiores, enquanto o tromboembolismo pulmonar (TEP) é uma complicação causada pelo desprendimento e alojamento do trombo na artéria pulmonar, causando obstrução do fluxo sanguíneo. Como principais mecanismos que causam a trombose venosa figuram as alterações que reduzem ou impedem o fluxo sanguíneo, além de fatores genéticos e ambientais que podem aumentar a incidência de tromboembolismo. Sabe-se que a cascata de coagulação é um evento que precisa ser equilibrado, por exemplo, na doença trombótica venosa hereditária há aumento da atividade ou abundância de proteínas que induzem a coagulação e/ou diminuição de proteínas inibitórias, resultando na maior probabilidade de formação de trombos. Da mesma forma, mutação pontual específica no gene que codifica o fator V – presente em cerca de 5% dos caucasianos – gera uma variante resistente à inativação pela proteína C, ativada por protease anticoagulante, o que induz o aumento da

coagulação. Outro fator que pode gerar a trombose venosa é a alta quantidade de fator tecidual circulante (MACKMAN, 2008) (**Figura 2**).

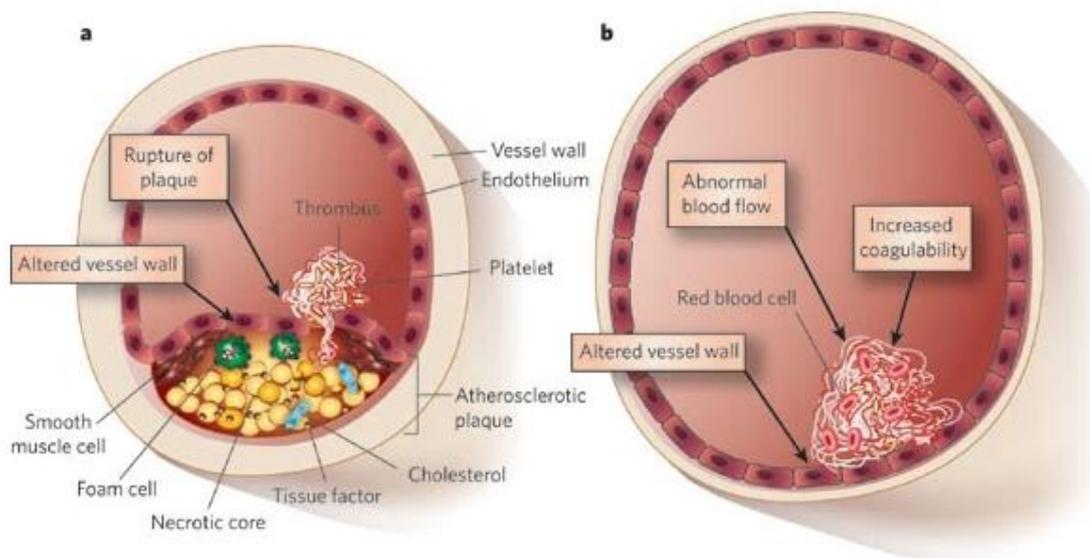


Figura 2. Representação da formação de trombo arterial e venoso, sendo a) arterial; b) venoso. Extraído de MACKMAN (2008).

Em relação à epidemiologia, dados da Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular (SBAVC) mostraram que entre janeiro de 2012 e maio de 2022, mais de 425 mil brasileiros foram internados para tratamento de TVP e mais de 86 mil para tratamento do TEP. Com isso, os autores observaram um aumento de 89% de internações no Brasil por estas doenças em 10 anos (SBAVC, 2022). Ainda, um levantamento da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH) mostrou que pacientes hospitalizados com pneumonia por COVID-19 moderada e grave possuem alta incidência de TEP, isso porque estes pacientes apresentam grande resposta inflamatória, podendo levar à formação de microcoágulos dentro dos pulmões, provavelmente contribuindo para altos níveis de mortalidade observados em pacientes com pneumonia por COVID-19 (MASTEN, 2020). Como mais um dado epidemiológico, estima-se a prevalência de trombose arterial em 4% da população com aumento proporcional à idade, variando de 0,9% abaixo dos 50 anos a até 14,5% acima dos 70 anos (SBAVC, 2020).

O tratamento de ambas as trombozes difere. Na trombose arterial, o foco são medicamentos que atuam nas plaquetas, enquanto na trombose venosa, o foco são medicamentos que atuam nas proteínas da cascata de coagulação. Medicamentos antitrombóticos disponíveis atualmente são eficazes na redução de ambas as

trombozes em indivíduos com doenças cardiovasculares, entretanto o principal efeito colateral é a hemorragia, fato que limita o uso desses agentes. Sendo assim, é necessária a contínua pesquisa de novos medicamentos com maior eficácia de forma a diminuir a indução de hemorragias (MACKMAN, 2008).

Sulfeto de hidrogênio e trombose

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um gás incolor, inflamável, solúvel em água, com característico odor desagradável de ovo podre. A inalação do H_2S proveniente de solos contaminados e locais de decomposição de material orgânico pode gerar intoxicação dependente da concentração e do tempo de duração da exposição. Em doses baixas, o H_2S pode causar irritação ocular; já em doses altas, pode causar lesão pulmonar, asfixia e parada cardiorrespiratória, podendo inclusive levar à morte (SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017). Acredita-se que a intoxicação seja pela inibição de enzimas respiratórias, principalmente a citocromo C oxidase. O efeito da inibição da citocromo C oxidase é semelhante à rápida privação de oxigênio ou asfixia (CHEN; WANG, 2012; GUIDOTTI, 1996).

O H_2S também é sintetizado endogenamente em células de mamíferos, principalmente pela ação de quatro vias enzimáticas, são elas: a cistationina- γ -liase (CSE), a cistationina- β -sintase (CBS), a 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3MST) associada à cisteína aminotransferase (CAT) e a D-aminoácido oxidase (DAO) (JULIAN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; CHEN; WANG, 2012; BELTOWSKI, 2019; CAO *et al.*, 2019). As primeiras três vias utilizam L-cisteína como principal precursor do H_2S enquanto a DAO catalisa a transformação da D-cisteína em 3-mercaptopiruvato, que em seguida dá origem ao H_2S por ação da 3MST. A CBS produz H_2S principalmente ao catalisar a reação de L-homocisteína e L-cisteína a L-cistationina e H_2S . Em resumo, na presença de L-cisteína, CBS gera H_2S por uma reação de substituição beta que ocorre juntamente com a produção de L-serina. Foi visto ainda que a taxa de geração de H_2S nessa reação é acelerada em até 23 vezes na presença de L-homocisteína (SINGH *et al.*, 2009). CSE, por sua vez, produz H_2S ao catalisar tanto a via de eliminação alfa e beta da L-cisteína como a via de eliminação alfa e gama da homocisteína. Já a produção de H_2S pela ação da 3MST tem início com a conversão de L-cisteína em 3-mercaptopiruvato (3MP) pela CAT, em seguida, a 3MST transfere um átomo de enxofre do 3MP para ele mesmo, o que leva à formação do persulfeto. H_2S é então liberado do persulfeto na presença de um agente

reductor, tal qual a tioredoxina (XIE *et al.*, 2016). Essas reações se dão no citoplasma e/ou na mitocôndria. Outra fonte de 3MP é a D-cisteína via ação da DAO localizada no peroxissoma. Trocas de metabólitos entre o peroxissoma e a mitocôndria levam à ida de 3-MP para a mitocôndria, onde ela é catalisada em H₂S pela 3MST (SHIBUYA; KIMURA, 2013). Esquema simplificado da síntese do H₂S é visto na **Figura 3**. A DAO é exclusivamente localizada no cérebro e rins, a CBS é a mais expressa no cérebro (LEE *et al.*, 2009), entretanto, estudos mostraram a expressão das enzimas CSE, CBS e 3MST em diversos locais do organismo, incluindo vias respiratórias, fígado, rins, enterócitos, células do músculo liso vascular, útero, pâncreas, miócitos cardíacos e células do sistema imune, como neutrófilos, células natural killer (NK), células dendríticas, entre outras (KAMOUN, 2004; DILEK *et al.*, 2020). Vias não enzimáticas também podem dar origem ao H₂S a partir de persulfetos, tiosulfatos e polissulfetos e na presença de NADH ou NADPH (SEARCY; LEE, 1998; OLSON *et al.*, 2013).

metabolismo do DNA, modulação de proteínas quinase, regulação do ciclo celular e organização do citoesqueleto (SZABO, 2018). As ações regulatórias do H₂S se devem à adição de um grupo tiol às proteínas, com S-sulfetação ou formação de persulfeto (-SHH) (MUSTAFA *et al.*, 2009). Isso resulta em alteração das ações fisiológicas das proteínas modificadas, por exemplo, estimulando a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e de potencial transitório (TRP), inibindo fosfodiesterases de AMP_c e GMP_c, aumentando as concentrações intracelulares desses segundos mensageiros e doando elétrons para a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ao interagir com a enzima quinona sulfeto oxidorreductase (SZABO *et al.*, 2014). Assim, foi observado que, em concentrações fisiológicas, o H₂S é importante na manutenção das funções do sistema nervoso e cardiovascular (YANG, 2008; KIMURA, 2013) e exogenamente administrado, foram vistos efeitos prolongando a vida, anti-inflamatório e no reparo de lesões teciduais (GEMICI; WALLACE, 2015).

Neste sentido, foi visto que o H₂S também influencia o processo de coagulação sanguínea. De fato, experimentos utilizando um conhecido doador inorgânico de liberação rápida de H₂S, o NaHS, mostrou ação antitrombótica do H₂S em concentrações próximas às fisiológicas, ao inibir diferentes etapas da ativação plaquetária e formação do trombo (ZAGLI *et al.*, 2007). A ação do H₂S inibindo a agregação plaquetária envolve inibição da sinalização mediada por Ca²⁺ de forma dependente do AMP_c (NISHIKAWA *et al.*, 2013; GRAMBOW *et al.*, 2014). Sugere-se que ocorre sulfetação de proteínas plaquetárias envolvidas com a exocitose de grânulos e mudança na forma das plaquetas após a sua ativação (GRAMBOW *et al.*, 2014). Foi verificada ainda ação do H₂S modificando propriedades adesivas de importantes moléculas não plaquetárias, mas diretamente envolvidas com o processo de coagulação, são elas: colágeno e fibrinogênio (MOREL *et al.*, 2012). Além disso, foi visto também que a ação antioxidante do H₂S pode responder por sua ação antitrombótica (MOREL *et al.*, 2012). De fato, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERONS) podem levar à ativação plaquetária (GREGG *et al.*, 2004). Outro mecanismo envolve redução da expressão da molécula de adesão plaquetária P-selectina por ação do H₂S (GRAMBOW *et al.*, 2014). Apesar de grande parte dos experimentos que mostraram papel do H₂S sobre a coagulação sanguínea ter sido realizado com doadores inorgânicos, a liberação rápida do H₂S por esses agentes pode ser deletéria para células e tecidos; desta forma, agentes doadores de H₂S com cinéticas de atuação mais longas ou que atuem em locais compartimentalizados

dentro das células ou ainda agentes híbridos contendo doadores de H₂S ligados a moléculas que sabidamente interferem no processos de coagulação sanguínea, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), mas que causem menos reações adversas gastrintestinais, tem grande potencial de serem translacionados para a clínica, na prevenção da formação de trombos em indivíduos suscetíveis (GUO *et al.*, 2013).

ATB-346: Possível efeito sobre a formação de trombos

A ação do H₂S na hemostasia ainda não é totalmente conhecida. Em relação à sua participação na trombose, estudos mostraram que o H₂S tem propriedades antiplaquetárias por inibição do ADP, colágeno, epinefrina, ácido araquidônico, mimético de tromboxano e trombina (ZAGLI *et al.*, 2007), exerce ação antitrombótica pela regulação positiva da síntese de óxido nítrico (KRAM, 2013) e pode regular a trombogênese por interferir na atividade e agregação plaquetária mediada por moléculas de adesão, causando diminuição de P-selectina, GPIb e GPIIb/IIIa (GRAMBOW, *et al.*, 2014 ; OLAS, 2015). Em virtude dos efeitos fisiológicos do H₂S no organismo e participação na fisiopatologia de doenças, para o maior controle da concentração de H₂S no organismo, doadores de H₂S foram sintetizados, com o intuito de servirem como potenciais agentes terapêuticos.

Os doadores de H₂S podem ser classificados em algumas classes, como: doadores inorgânicos de H₂S, como o NaHS e Na₂S; precursores da síntese endógena de H₂S, como N -acetilcisteína e a L -cisteína; doadores sintéticos de H₂S, como GYY4137 - um derivado do reagente de Lawesson - e híbridos de antiinflamatórios não esteróides, como o ATB-337 - derivado do diclofenaco - e ATB-346 - derivado do naproxeno (GUO *et al.* 2013). Neste projeto, estudaremos o efeito de um deles no processo de formação de trombos, o híbrido ATB-346 (**Figura 4**).

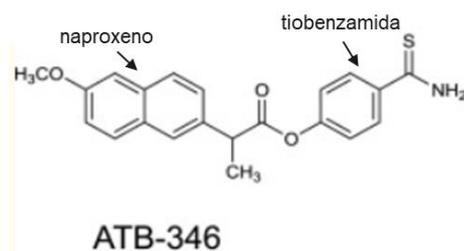


Figura 4. Estrutura química do ATB-346.

O novo composto ATB-346 ([2-(6-metóxi-naftaleno-2-il)-ácido propiônico 4-tiocarbamoil-fenil éster]) foi criado com o intuito de melhorar o perfil terapêutico do naproxeno – anti-inflamatório não esteroide (AINE) frequentemente utilizado na clínica por ser considerado o mais seguro do ponto de vista cardiovascular –, principalmente no que se refere às reações adversas gastrintestinais, frequentemente observadas com o uso prolongado e/ou com altas doses. Para isso, a tiobenzamida (TBZ) – porção doadora de H₂S – foi acoplada ao naproxeno (**Figura 4**). A partir daí, estudos demonstraram atividade anti-inflamatória semelhante ao composto original, na ausência de reações adversas gastrintestinais (WALLACE *et al.*, 2020). Sua ação anti-inflamatória se deve a mecanismo semelhante ao do naproxeno isoladamente, ou seja, supressão rápida e duradoura (24h) da atividade da COX, com consequente redução da síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) e tromboxano B₂ (TXB₂), redução da infiltração leucocitária e da concentração das citocinas inflamatórias, dentre elas, interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e da proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP1) (DINGENEN *et al.*, 2019; GLANVILLE *et al.*, 2021). A atuação do ATB-346 sobre a produção de TXB₂ pode influenciar a hemostasia, inclusive de forma benéfica na prevenção da formação de trombos, mas isso ainda precisa ser investigado (LELIÈVRE *et al.*, 2019).

Conclusões

Os resultados obtidos experimentalmente e contidos nesta dissertação mostram pela primeira vez o efeito do ATB-346 retardando o início e a oclusão total de vasos sanguíneos cerebrais causados pelo efeito sinérgico do naproxeno e tiobenzamida, portanto, funcionando como um potencial novo tratamento para a trombose. O mecanismo de ação antitrombótico pode decorrer também de um efeito sinérgico de redução do H₂S circulante e redução da expressão hepática do fibrinogênio.

Referências bibliográficas

- ARNOUT, J., et al. Haemostasis. **The Vascular Endothelium II**. p. 1-41, 2006.
- BELTOWSKI, J. Synthesis, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Hydrogen Sulfide: An Overview: vascular effects of hydrogen sulfide. **Methods In Molecular Biology**. v. 2007, p. 1-8, 2019.
- CAGNOLATI, D., et al. Hemostasia e distúrbios da coagulação. **USP**, p. 1–28, 2017.
- CAO, X., et al. A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 31, n. 1, p. 1-38, 2019.
- CARMELIET, P., JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011.
- CASEY, G. Haemostasis, anticoagulants and fibrinolysis. **Nursing Standard**, v. 18, n. 7, p. 45-51, 2003.
- CHEN, X., et al. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52082-52086, 2004.
- CHEN, Y., WANG, R. The message in the air: Hydrogen sulfide metabolism in a chronic respiratory diseases. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 184, n. 2, p. 130-138, 2012.
- DILEK, N., et al. Hydrogen sulfide: an endogenous regulator of the immune system. **Pharmacological Research**. v. 161, p. 105119, 2020.
- DINGENEN, J. V., et al. The H₂S-Releasing Naproxen Derivative ATB-346 and the Slow-Release H₂S Donor GYY4137 Reduce Intestinal Inflammation and Restore Transit in Postoperative Ileus. **Frontiers in Pharmacology**. v. 10, p. 116, 2019.
- GEMICI, B., WALLACE, J. L. Anti-inflammatory and cytoprotective properties of hydrogen sulfide. **Methods in Enzymology**. v. 555, p. 169-193, 2015.
- GLANVILLE, J. R. W., et al. Potent anti-inflammatory effects of an H₂S-releasing naproxen (ATB-346) in a human model of inflammation. **The FASEB Journal**. v. 35, n. 10, p. e21913, 2021.
- GOTO, S., HASEBE, T., TAKAGI, S. Platelets: small in size but essential in the regulation of vascular homeostasis translation from basic science to clinical medicine. **Circulation Journal**, v. 79, n. 9, p. 1871-1881, 2015
- GRAMBOW, E., et al. Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice. **Platelets**, v. 25, n. 3, p. 166-174, 2014.
- GREGG, D., et al. Integrins and coagulation: a role for ROS/redox signaling? **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 6, n. 4, p. 757-764, 2004.
- GRESELE, P., et al. Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy. **Trends In Pharmacological Sciences**. v. 29, n. 7, p. 352-360, 2008.
- GUIDOTTI, T.L. Hydrogen sulphide. **Occupational Medicine**. v. 46, n. 5, p. 367-371, 1996.
- GUO, W., et al. Hydrogen sulfide and translational medicine. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 34, n. 10, p.1284–1291, 2013.

- HUGHES, M. N., et al. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 47, n. 10, p. 1346-1353, 2009.
- JULIAN, D., et al. Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A—Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 105-115, 2002.
- KAMOUN, P. H₂S, un nouveau neuromodulateur, **Médecine/Sciences**, v. 20, n. 6-7, p. 697-700, 2004.
- KIMURA, H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. **Neurochemistry International**. v. 63, n. 5, p. 492-497, 2013.
- KIMURA, Y., et al. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. **The FASEB Journal**. v. 27, n.6, p.2451-2457, 2013.
- KRAM, L., et al. The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases. **Thrombosis Research**. v. 132, n. 2, p. 112-117, 2013.
- LEE, M. et al. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. **Neurobiology Of Aging**. v. 30, n. 10, p. 1523-1534, 2009.
- LELIÈVRE, B. et al. Severe poisoning with naproxen causing coagulopathy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 126, n. 5, p. 458-463, 2019.
- MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**. v. 451, n. 7181, p. 914-918, 2008.
- MASTEN, A. A approach for managing venous thromboembolism in patients with COVID-19. **International Society on Thrombosis and Haemostasis**, 2020.
- MOREL, A. et al. Hydrogen sulfide changes adhesive properties of fibrinogen and collagen in vitro. **Platelets**. v. 25, n. 2, p. 147-149, 2012.
- MUSTAFA, A. K., et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration. **Science Signaling**. v. 2, n. 96, p. 72nov. 2009.
- NISHIKAWA, H., et al. Inhibition by hydrogen sulfide of rabbit platelet aggregation and calcium mobilization. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 36, n. 8, p. 1278-1282, 2013.
- NORRIS, L. A. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. v. 17, n. 3, p. 369-383, 2003.
- OLAS, B. Gasomediators (·NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 445, p. 115-121, 2015.
- OLSON, K. R., et al. Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 305, n. 6, p. R592-603, 2013.
- SARVANANTHAN, T; DAS, S. Thrombosis: simplified. **Phlebology: The Journal of Venous Disease**. v. 27, n. 2, p. 12-22, 2012.
- SCHARF, R. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: part 1. **Hämostaseologie**, v. 38, n. 04, p. 203-210, 2018.
- SEARCY, D. G.; LEE, S. H. Sulfur reduction by human erythrocytes. **Journal of Experimental Zoology**. v. 282, n. 3, p. 310-322, 1998.

SHIBUYA, N; KIMURA, H. Production of Hydrogen Sulfide from D-Cysteine and Its Therapeutic Potential. **Frontiers In Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 1-3, 2013.

SINGH, S. et al. Modulation of the heme electronic structure and cystathionine beta-synthase activity by second coordination sphere ligands: The role of heme ligand switching in redox regulation. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, n. 5, p. 689-697, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E DE CIRURGIA VASCULAR (SBACV). Estimativa SBACV 2020. [https://sbacv.org.br/imprensa/estimativas/#:~:text=OBSTRU%C3%87%C3%83O%20ARTERIAL%20CR%C3%94NICA%20DE%20MEMBROS%20\(TROMBOSE%20ARTERIAL\)&text=A%20preval%C3%Aancia%20geral%20%C3%A9%20de,homens%20em%20rela%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A0s%20mulheres\).](https://sbacv.org.br/imprensa/estimativas/#:~:text=OBSTRU%C3%87%C3%83O%20ARTERIAL%20CR%C3%94NICA%20DE%20MEMBROS%20(TROMBOSE%20ARTERIAL)&text=A%20preval%C3%Aancia%20geral%20%C3%A9%20de,homens%20em%20rela%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A0s%20mulheres).)

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E CIRURGIA VASCULAR (SBACV). Trombose venosa é responsável por 113 internações diárias no Brasil, revela SBACV (<https://sbacv.org.br/trombose-venosa-e-responsavel-por-113-internacoes-diarias-no-brasilrevela-sbacv/>).

SZABO, C. A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: from environmental toxin to biological mediator. **Biochemical Pharmacology**. v. 149, p. 5-19, 2018.

SZABO, C., et al. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. **British Journal of Pharmacology**. v. 171, n. 8, p. 2099-2122, 2014.

SZABO, C., PAPAPETROPOULOS, A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. **Pharmacological Reviews**. v. 69, n. 4, p. 497-564, 2017.

TERUYA, J. Management Of Bleeding Patients. **Springer**. p. 3-10, 2021.

VANNI, D. S. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **J Bras Patol Med Lab**. v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.

WALLACE, J. L., et al. A proof-of-concept, Phase 2 clinical trial of the gastrointestinal safety of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug. **British Journal of Pharmacology**. v. 177, n. 4, p. 769-777, 2020.

WENDELBOE, A. M., RASKOB, G. E. Global Burden of Thrombosis. Epidemiologic Aspects. **Circulation Research**. v. 118, n. 9, p. 1340-1347, 2016.

XIE, Z. Z., et al. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, p. 6043038, 2016.

YANG, G. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. **Science**. v. 322, n. 5901, p. 587-590, 2008.

ZAGLI, G., et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 1, p. 65-68, 2007.

ZHANG, Y., et al. Signaling mechanisms of the platelet glycoprotein Ib-IX complex. **Platelets**, v. 33, n. 6, p. 823-832, 2022.