

Inibição e reversão da agregação plaquetária de eqüinos *in vitro* com o uso de ketoprofeno, fenilbutazona e flunixim meglumine¹

Fabiola O. Paes Leme^{2*}, Laurenz Wurzinger³, Geraldo E.S. Alves², Adriane P. da Costa-Val², Marcos B. Pinotti⁴, Paulo Ricardo Oliveira Paes² e Marcos E. C. Oliveira⁵

ABSTRACT.- Paes Leme F.O., Wurzinger L., Alves G.E.S., Costa-Val A.P., Pinotti M.B., Paes P.R.O. & Oliveira M.E.C. 2009. [*In vitro* inhibition and reversion of equine platelet aggregation using ketoprophen, phenylbutazone and flunixin meglumin.] Inibição e reversão da agregação plaquetária de eqüinos *in vitro* com o uso de ketoprofeno, fenilbutazona e flunixim meglumine. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(10):803-808. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brazil. E-mail: fabiola@vet.ufmg.br

Several diseases may lead to platelet pre-activation and hypercoagulability states in horses. The activity of many drugs against platelet aggregation may, not only contribute to the evaluation of a disease but also its response to the therapy. With the aim to study *in vitro* prevention and reversion of platelet aggregation, the non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID): ketoprophen, phenylbutazone and flunixin-meglumin were evaluated. The comparison demonstrated that phenylbutazone and ketoprophen prevented platelet aggregation induced by ADP better than flunixin-meglumin, in a superior manner to the monoclonal antibody Reopro, and in a better way than the membrane receptor blockers Ro-438857 and RGDS. The reversion of platelet aggregation demonstrated that even phenylbutazone or ketoprophen have a dose-dependent effect.

INDEX TERMS: Aggregometry, ADP, REOPRO, RGDS, RO-438857, NSAID.

RESUMO.- Como são várias as enfermidades e os distúrbios que induzem à hipercoagulabilidade e à pré-ativação de plaquetas em eqüinos. A atividade de medicamentos utilizados para controle dessas enfermidades sobre a agregação de plaquetas pode, não apenas servir para avaliar sua evolução, como também a resposta terapêutica. Com o objetivo de avaliar a prevenção e a reversão da agrega-

ção plaquetária de eqüinos *in vitro* foram utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES): ketoprofeno, fenilbutazona e flunixim meglumine. A comparação demonstrou que a fenilbutazona e o ketoprofeno previnem a agregação de plaquetas de eqüinos induzida pelo ADP, de forma mais eficaz do que o flunixim-meglumine e, superior ao fragmento monoclonal de anticorpo Reopro, sendo semelhante a dos bloqueadores de receptores de membrana Ro-438857 e RGDS. Quanto a reversão da agregação plaquetária tanto a fenilbutazona quanto o ketoprofeno demonstraram efeitos dose-dependente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Agregometria, ADP, REOPRO, RGDS, RO-438857, AINES.

INTRODUÇÃO

As plaquetas têm várias funções no organismo de mamíferos, principalmente na hemostasia primária. Quando ativadas, as plaquetas aderem ao colágeno subendotelial, mudam de forma e liberam mediadores armazenados em

¹ Recebido em 11 de agosto de 2008.

Aceito para publicação em 29 de junho de 2009.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, 30123-970, Brasil. *Autor para correspondência: fabiola.ufmg@gmail.com

³ Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Pettenkoferstr. 11, D-80336 München, Alemanha.

⁴ Departamento de Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil.

⁵ Pesquisador DCR, Universidade Federal do Pará (UFPA), Rua Augusto Corrêa 1, Belém, PA 66075-110, Brasil.

suas organelas, assim como se agregam umas às outras para formar o tampão hemostático primário (Weiss et al. 1997a, Nyarko et al. 1998). Embora as plaquetas façam parte do equilíbrio hemostático, nem sempre as alterações de plaquetas estão relacionadas a distúrbios do sistema de coagulação (Wurzinger & Schmid-Schönbein, 1990), já que possuem propriedades particulares e podem responder a diversos mediadores liberados pela ativação de outros tipos celulares, a partir de estímulos diversos (Calkins et al. 1974, Wurzinger & Schmid-Schönbein 1985, Wurzinger 1990, Ablett et al. 1997).

Em situação normal as plaquetas não aderem ao endotélio, a menos que este se encontre alterado, ou que as plaquetas se encontrem previamente ativadas na circulação (Weiss et al. 1997a, Reininger et al. 1998). As disfunções de plaquetas ocorrem em diversas enfermidades nos eqüinos, tais como cólica, tromboembolismo nas artérias ilíacas, síndrome do navicular (Weiss et al. 1997a), laminite (Weiss et al. 1996) e endotoxemia (Jarvis & Evans 1994). Segundo Dvorak et al. (1994), a trombose é um estado de hipercoagulabilidade mediada por agentes pró-inflamatórios, liberados no curso de diversas enfermidades. Como a ativação inapropriada de plaquetas pode resultar em tromboembolismo e, até mesmo trombose e morte (Heath et al. 1994), os processos inflamatórios devem ser considerados como potenciais causas de morte em eqüinos portadores distúrbios que predisponham a hipercoagulabilidade e tromboembolismo.

Desde os anos 80 sabe-se que a agregação de plaquetas é mediada por integrinas, que representam uma família de receptores de membrana (glicoproteínas) e, mediam a adesão e a interação entre células e tecidos, assim como a expressão de genes de crescimento, diferenciação e sobrevivência celulares (Miranti & Brugge 2002, Schwartz & Ginsberg 2002). Dentre estas integrinas as mais importantes são: o receptor ao colágeno (GP Ia/IIa), à fibronectina (GP Ic/IIIa), à laminina (Ic/IIa), à vitronectina (Va) e ao fibrinogênio (IIb/IIIa) dependente de ativação (Pintado et al. 1995). Trabalhos *in vitro* permitiram sugerir que a maior atividade na agregação de plaquetas de mamíferos seja a da integrina GP IIb/IIIa na presença do fibrinogênio (Meyers et al. 1979a), o que tem motivado esforços para bloquear tal receptor e inibir a agregação de plaquetas de mamíferos, prevenindo, assim a trombose.

Pouco se sabe sobre as integrinas presentes na membrana das plaquetas de eqüinos. Pintado et al. (1995) desenvolveram o anticorpo monoclonal contra a GP IIb/IIIa de eqüinos, presumindo que esta seja semelhante a do homem. Entretanto, estudos realizados por Jarvis e Evans (1994) sugeriram que o sistema de coagulação dos eqüinos possa diferir do de humanos, onde o tromboxano A_2 tem função principal na agregação de plaquetas. De acordo com Heath et al. (1994), as plaquetas de eqüinos poderiam ser ativadas por vias independentes das enzimas ciclo-oxigenases, que originam o tromboxano.

Os agonistas mais conhecidos da agregação de plaquetas *in vitro* são o ADP (Heath et al. 1994), a trombina

(Sinakos & Caen 1967), a adrenalina (Meyers et al. 1979a), o colágeno (Bourdreaux et al., 1988, Rosenblum, 1997), o ácido araquidônico (Bourdreaux et al. 1988, Heath et al. 1994) e o PAF (Suquet & Leid 1983, Weiss, et al. 1997b). Segundo Weiss et al. (1997b), a agregação de plaquetas induzida pelo adenosina difosfato (ADP) e pelo fator de agregação de plaquetas (PAF) não depende das ciclo-oxigenases, enquanto que a induzida pelo colágeno é apenas parcialmente dependente.

Uma das classes de inibidores da agregação de plaquetas são as glicoproteínas, antagonistas da GP IIb/IIIa. Esses compostos sintéticos contêm uma seqüência de três a quatro aminoácidos, idêntica à da cadeia do fibrinogênio que, ao se ligarem aos seus receptores, inibem a agregação de plaquetas. Estes compostos são conhecidos pelas siglas RGD (arginina, glicina, ácido aspártico), RGDS (serina, arginina, glicina, ácido aspártico), RPR 110885 (Weiss et al. 1997b) e Ro-438857 (Reininger et al. 1998). Já os antiinflamatórios não esteroidais antagonizam a agregação de plaquetas, provavelmente bloqueando a via do ácido araquidônico, na maioria das espécies (Meyers et al. 1979b, Goetz 1989, Heath et al. 1994).

Como são várias as enfermidades e os distúrbios que induzem à hipercoagulabilidade (Dvorak et al. 1994) e à pré-ativação de plaquetas em eqüinos (Weiss et al. 1997a, Reininger et al. 1998), o estudo da agregação de plaquetas nessa espécie é importante para a avaliação da função desses elementos figurados (Heath et al. 1994, Jarvis & Evans 1994, Weiss et al. 1996, 1997a). A atividade de medicamentos utilizados para controle dessas enfermidades sobre a agregação de plaquetas pode, não apenas servir para avaliar sua evolução, como também a resposta terapêutica.

Baseado nos resultados das pesquisas de Pintado et al. (1995), Weiss et al. (1997a,b) e Reininger et al. (1998), comparou-se a agregação de plaquetas de eqüinos *in vitro* utilizando-se Ro-438857 (peptídeo análogo), RGDS (tetrapeptídeo) e Reopro (fragmento monoclonal de anticorpo de *rato* contra a GP IIb/IIIa de *humano*) e a capacidade dos antiinflamatórios não-esteroidais: ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine, em inibir e reverter a agregação de plaquetas de eqüinos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta mL de sangue foram coletados de 20 eqüinos hípidos, machos, inteiros (1 *Haflinger*, 3 *Bayerisches Warmblut* e 16 Puro Sangue Inglês), utilizando-se agulhas 40x12G e seringas plásticas⁶ de 50mL, contendo citrato de sódio a 3,8% (uma parte de citrato para nove de sangue). Os animais não receberam medicação por, no mínimo, sete dias prévios. Os primeiros 3mL de sangue foram dispensados como sugeriu Wurzinger (1990), para evitar contaminação da amostra por fatores teciduais da coagulação. As amostras mantidas a 37°C desde a coleta até o processamento.

No laboratório as amostras de sangue foram acondicionadas em frascos plásticos estéreis, siliconizados e, centrifugadas⁷ por 3min. a 260g (1200rpm) para a obtenção do sobrenadante:

⁶ Seringas de perfusão, Bacton und Dickinson, Alemanha.

⁷ Labofuge 400, Heraeus, Alemanha.

o plasma rico em plaquetas (PRP). Para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) 5mL de PRP foram centrifugados por 10min. a 590g (2600rpm). Durante o processo todas as amostras foram mantidas em banho-maria, à temperatura constante de 37°C, sendo analisadas no período máximo de 4 horas após a coleta. Este protocolo de centrifugação foi estabelecido a partir da contagem de plaquetas para atender a necessidade mínima de 90.000 plaquetas/μL de plasma, com contagens de hemácias e leucócitos inferiores a 3000/μL e 5000/μL, respectivamente. As plaquetas foram contadas em hemocítmetro⁸ após diluição com mepacrina⁹ (50mM), em microscópio ótico de luz invertida¹⁰.

A agregação de plaquetas foi avaliada por um método turbidimétrico, utilizando-se reoagregômetro (APACT¹¹). As amostras foram acondicionadas em cubetas de plástico siliconizadas, contendo um magneto cuja rotação foi mantida a 1000rpm, para homogeneizar as amostras de plasma com os reagentes posteriormente a ele adicionados. As curvas de agregação obtidas foram analisadas pelo programa APACT/pro-software 1,1 para Windows 95. O programa permitiu avaliar, também, a mudança de forma das plaquetas - ativação plaquetária - além da agregação máxima (%).

100μM de ADP¹² foram adicionados ao sistema, antes e depois dos diferentes reagentes (Quadro 1), para se avaliar a

Quadro 1. Concentração final dos reagentes utilizados como antagonistas da agregação de plaquetas de eqüinos *in vitro*

Reagentes ^a	Concentração	Dose correspondente
Fenilbutazona ¹³	12,7μM	4,4 mg/kg de peso corporal animal
Fenilbutazona	6,4μM	2,2 mg/kg de peso corporal animal
Ketoprofeno ¹⁴	9,6μM	2,2 mg/kg de peso corporal animal
Ketoprofeno	4,8μM	1,1 mg/kg de peso corporal animal
Flunixin meglumine ¹⁵	2,4μM	1,1mg/kg de peso corporal animal
Flunixin meglumine	1,2μM	0,55mg/kg de peso corporal animal
Ro-438857 ¹⁶	10,0μM	10μM/L
RGDS ¹⁷	700μM	700μM/L
Reopro ¹⁸	0,25mg/mL	0,25mg/mL

^a Fenilbutazona, flunixin meglumine e ketoprofeno = antiinflamatórios não esteroidais; Ro-438857 = peptídeo análogo; RGDS = tetrapeptídeo; Reopro = fragmento de anticorpo monoclonal GP IIb/IIIa.

eficiência destes em prevenir ou reverter a agregação de plaquetas, respectivamente. As curvas obtidas com o uso do PBS representaram as curvas controle.

Para se avaliar o efeito dos AINE a serem estudados: ketoprofeno, a fenilbutazona e o flunixin meglumine, comparações foram feitas com reagentes que, sabidamente, previnem

⁸ Câmara de Neubauer espelhada, BOECA, Alemanha.

⁹ Sigma, Alemanha.

¹⁰ Zeiss, Alemanha.

¹¹ APACT 2 (Automated Platelet Aggregation and Coagulation Tracer), Labor Fibrinter, Alemanha.

¹² ADP-Adenosina Difosfato, Sigma, Alemanha.

¹³ Equipalazone®, Marcolab Laboratórios Ltda, Brasil.

¹⁴ Ketofen®, Marcolab Laboratórios Ltda, Brasil.

¹⁵ Flumegan®, Marcolab Laboratórios Ltda, Brasil.

¹⁶ Ro- 43-8857, Peptídeo sintético análogo, Knoll GmbH, Alemanha.

¹⁷ RGDS (ARG-GLY-ASP-SER), Sigma, Alemanha.

¹⁸ Reopro = Fragmento de anticorpo monoclonal (fmoab) contra GP IIb/IIIa. Rato contra humano, Lilly, Alemanha.

a agregação de plaquetas em humanos: o RGDS (tetrapeptídeo), o Ro-438857 (peptídeo análogo) e o Reopro (fragmento de anticorpo monoclonal contra GP IIb/IIIa). Todos esses reagentes bloqueiam seletivamente os receptores GP IIb/IIIa de plaquetas de humanos, quer pela similaridade estrutural com o fibrinogênio, quer pela especificidade do anticorpo. As concentrações utilizadas encontram-se sumarizadas no Quadro 1.

As curvas obtidas foram comparadas de forma pareada antes e depois da adição dos fármacos ao sistema, pelo teste t de Student, utilizando-se o programa estatístico GraphPad/Prism 3.0, com grau de significância de 5%.

RESULTADOS

A contagem média de plaquetas no PRP de eqüinos foi de 2,11±0,75 (x10⁵/μL), semelhantes ao obtido por Meyers et al. (1979b) e Bourdreaux et al. (1988). A Figura 1 de-

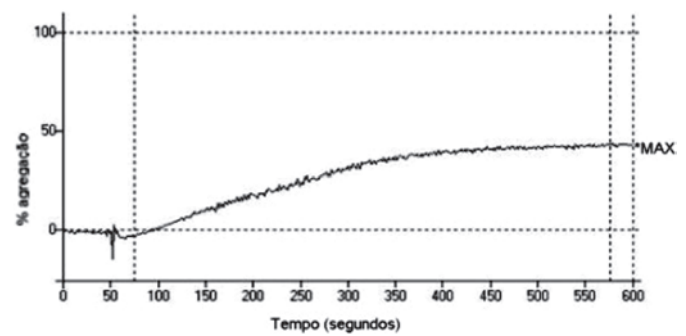


Fig.1. Exemplo de curva de agregação máxima de plaquetas de eqüinos *in vitro* induzida pelo ADP 100μM. Aos 50 segundos nota-se diminuição da transmitância observada pelo sensor ótico (relativo a adição do ADP ao sistema, seguido da mudança de forma das plaquetas) e posterior agregação crescente de plaquetas, até o limite máximo de tempo (600 segundos).

Quadro 2. Médias e desvios padrões da agregação máxima de plaquetas (%) em plasma de eqüinos, obtida com adição de ADP 100μM, após incubação da amostra de PRP^a com os diferentes reagentes apresentados, representando a prevenção da agregação plaquetária. A agregação com PBS representa a curva controle

Reagentes ^b	Agregação máxima
PBS	48,69 ^a ± 11,24
Ro-438857 10μM	8,84 ^{cd} ± 2,39
RGDS 700μM	12,45 ^c ± 7,44
Reopro 0,25mg/mL	43,59 ^a ± 11,24
Fenilbutazona 12,7μM	6,83 ^d ± 3,57
Fenilbutazona 6,4μM	20,24 ^b ± 9,8
Flunixin meglumine 2,4μM	36,14 ^a ± 15,99
Flunixin meglumine 1,2μM	44,66 ^a ± 14,49
Ketoprofeno 9,6μM	11,28 ^c ± 6,93
Ketoprofeno 4,8μM	39,15 ^a ± 13,37

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

^a PRP = plasma rico em plaquetas, ADP = adenosina difosfato.

^b PBS = tampão, Ro-438857 = peptídeo análogo, RGDS = tetrapeptídeo, Reopro = fragmento de anticorpo monoclonal GP IIb/IIIa, fenilbutazona, flunixin meglumine e ketoprofeno = antiinflamatórios não esteroidais.

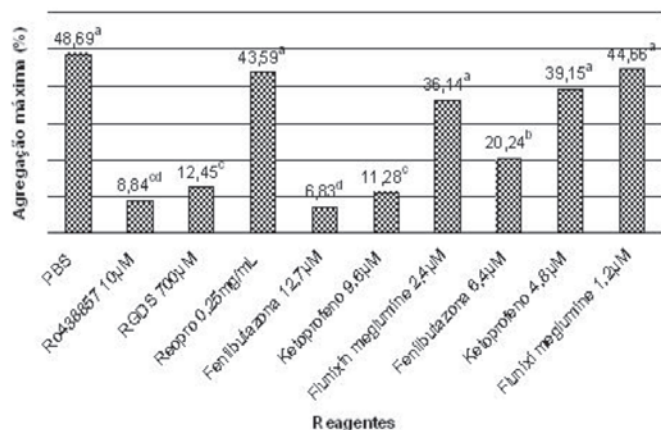


Fig.2. Agregação máxima de plaquetas de eqüinos (%) obtida com adição de ADP 100µM, após incubação da amostra de PRP com os diferentes reagentes apresentados (prevenção). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

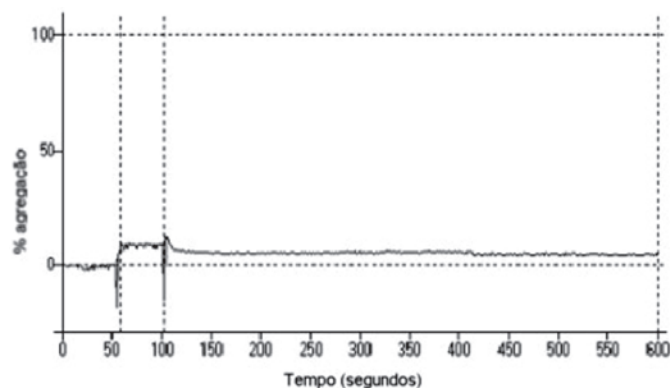


Fig.3. Exemplo de curva de agregação de plaquetas em plasma de eqüinos *in vitro* induzida pela adição do ADP 100µM após a incubação com antagonista da agregação (Inibição). Aos 50 segundos foi adicionado ao sistema o antagonista e aos 100 o ADP. Nesse exemplo foi utilizado o ketoprofeno 9,6µM.

Quadro 3. Médias e desvio padrões da reversão da agregação máxima de plaquetas em plasma de eqüinos (%), obtida pelo uso dos diferentes reagentes após adição de ADP 100µM

Reagentes	Reversão da agregação
ADP/PBS	2,30 ^b ±1,20
ADP/Ro-438857 0,25mg/mL	36,33 ^a ±22,17
ADP/RGDS 700µM	13,08 ^b ±20,71
ADP/Fenilbutazona 12,7µM	51,86 ^a ±12,08
ADP/Fenilbutazona 6,4µM	17,50 ^b ±3,50
ADP/Flunixin Meglumine 2,4µM	2,47 ^b ±6,96
ADP/Flunixin Meglumine 1,2µM	2,15 ^b ±5,20
ADP/Ketoprofeno 9,6µM	44,75 ^a ±11,37
ADP/Ketoprofeno 4,8µM	15,20 ^b ±4,80

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

^a ADP = adenosina difosfato, PBS = tampão, Ro-438857 = peptídeo análogo, RGDS = tetrapeptídeo, fenilbutazona, flunixin meglumine e ketoprofeno = antiinflamatórios não esteroidais.

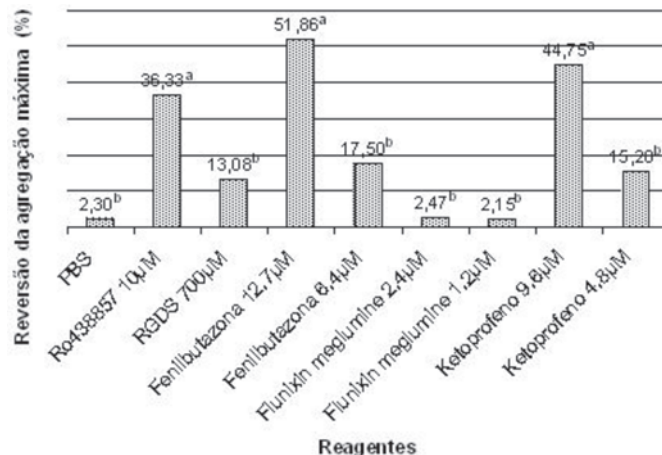


Fig.4. Reversão da agregação máxima de plaquetas de eqüinos (%), obtida pelo uso dos diferentes reagentes após adição de ADP 100µM. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

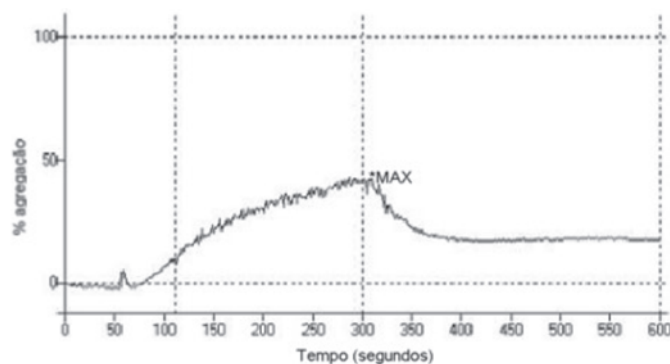


Fig.5. Exemplo de curva de agregação de plaquetas em plasma de eqüinos *in vitro* induzida pelo ADP 100µM e posterior reversão pela adição de antagonista. Aos 50 segundos foi adicionado o ADP ao sistema e posterior agregação crescente de plaquetas, até limite máximo (*MAX), com posterior reversão a partir do momento da adição (300 seg) do antagonista. Nesse exemplo foi utilizada fenilbutazona 12,7µM.

monstra um exemplo de curva de agregação de plaquetas de eqüinos *in vitro* induzida pela ação do ADP 100µM, cuja agregação máxima foi de 48,69%.

Os resultados da agregação máxima de plaquetas obtidos neste estudo encontram-se sumarizados no Quadro 2 e representados na Figura 2. A agregação máxima de plaquetas, obtida com o uso de fenilbutazona 12,7µM (Quadro 2 e Figura 2) demonstrou que esse reagente é capaz de prevenir a agregação de plaquetas de eqüinos de forma mais eficiente que todos os outros fármacos testados, sendo semelhante ao Ro-438857 10µM, e seguido pelo ketoprofeno 9,6µM, RGDS 700µM e fenilbutazona 6,4µM. Exemplo da curva de prevenção pode ser observado na Figura 3.

Quanto à reversão da agregação, a fenilbutazona 12,7µM, o ketoprofeno 9,6µM e o Ro-438857 10µM mostraram-se superiores aos demais reagentes (Quadro 3, Fig.4). Essa reversão não havia sido descrita anteriormen-

Quadro 4. Mudança de forma de plaquetas (%) de equinos induzida pelos diferentes reagentes

Reagentes	Mudança de forma (%)
ADP- PBS	8,27 ^{ab} ±13,48
Ro-438857 10µM	5,20 ^{ab} ±15,74
RGDS 700µM	6,54 ^{ab} ±8,32
Reopro 0,25mg/mL	13,55 ^a ±17,77
Fenilbutazona 12,7µM	2,96 ^b ±4,03
Fenilbutazona 6,4µM	3,35 ^{ab} ±3,40
Flunixin meglumine 2,4µM	2,74 ^b ±4,72
Flunixin meglumine 1,2µM	4,78 ^{ab} ±9,73
Ketoprofeno 9,6µM	4,94 ^{ab} ±13,86
Ketoprofeno 4,8µM	5,75 ^{ab} ±4,95

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

^a PBS = tampão, ADP = adenosina difosfato, Ro-438857 = peptídeo análogo, RGDS = tetrapeptídeo, Reopro = fragmento de anticorpo monoclonal GP IIb/IIIa, fenilbutazona, flunixin meglumine e ketoprofeno = antiinflamatórios não esteroidais.

te. Exemplo da curva de reversão pode ser vista na Figura 5.

Os resultados da mudança de forma das plaquetas podem ser observados no Quadro 4. A comparação entre os diferentes reagentes evidenciou a semelhança entre o ADP, o Ro-438857, o RGDS e o Reopro e a menor ativação quanto foram utilizados fenilbutazona 12,7µM e flunixin meglumine 2,4µM.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Como o número de plaquetas manteve-se dentro dos parâmetros desejáveis para a realização dos testes, não se fez necessário qualquer tipo de diluição com o PPP autólogo, como sugeriram Bourdreaux et al. (1988).

Os resultados referentes à agregação máxima de plaquetas em plasma de equinos induzida pelo ADP demonstraram que, à semelhança do observado por Wurzinger & Schmid-Schönbein (1985), as plaquetas de equinos são menos sensíveis ao ADP que as plaquetas de humanos.

A característica bifásica da agregação só pôde ser observado em 58% das análises realizadas. De acordo com Meyers et al. (1979a), esta característica reflete a agregação primária reversível - primeira fase, seguida da secreção endógena de ADP, que potencializa a agregação e a torna irreversível - segunda fase, determinando um segundo pico de agregação na curva. Bourdreaux et al. (1988) acreditaram que a falta de uma curva bifásica caracteriza uma agregação primária reversível, enquanto que Meyers et al. (1979a,b) consideraram que esse seja um achado esporádico que depende de fatores individuais, mais que da própria ação do ADP exógeno. Wurzinger & Schmid-Schönbein (1985) admitiram que em determinados casos as plaquetas possam ser refratárias ao ADP exógeno, adicionado ao sistema, caso tenham sofrido estímulo endógeno prévio, ou seja, tenham sido ativadas previamente.

Os resultados da agregação máxima demonstram que tanto o Ro-438857 quanto o RGDS são capazes de pre-

venir a agregação de plaquetas de equinos, de forma semelhante ao citado por Weiss et al. (1997b), e por Reininger et al. (1998), para humanos. Trabalhos como os de Weiss et al. (1997b), no entanto, não avaliaram o efeito de reversão da agregação, apenas o da inibição. Os resultados deste estudo sugerem que o Ro-438857 seja mais eficaz em reverter a agregação prévia do que o RGDS, que se mostrou inferior a fenilbutazona 12,7µM e ao ketoprofeno 9,6µM, como pode ser observado no Quadro 03. A fenilbutazona, por sua vez apresentou melhor atividade que o Ro-438857 em prevenir a agregação de plaquetas. Como tanto o Ro-438857 quanto o RGDS agem bloqueando os receptores GP IIb/IIIa a ativação e a agregação de plaquetas prévias podem ter reduzido a atividade desses compostos.

Weiss et al. (1997b) compararam os efeitos do RGDS e do RPR-110885, concluindo que esse último foi mais eficiente que o primeiro em prevenir a agregação de plaquetas. Os resultados obtidos no presente estudo assemelham-se aos de Weiss et al. (1997b), entretanto, foi o Ro-438857, o reagente superior ao RGDS. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido e tampouco foi discutido por Weiss et al. (1997b), mas poder-se-ia especular que tanto o RPR-110885 quanto o Ro-438857 seriam capazes de se ligar aos receptores de membrana de forma mais eficiente ou prolongada que o RGDS, ou mesmo se ligar a mais de um receptor.

A incubação com o Reopro não foi capaz de prevenir a agregação de plaquetas de equinos, sendo a curva de agregação muito semelhante à obtida com o uso do PBS, o que difere dos achados de Reininger et al. (1998), em humanos. Tal resultado se deve à especificidade do anticorpo monoclonal em se ligar a um fragmento específico da integrina GP IIb/IIIa de humanos, o que sugere uma diferença estrutural entre plaquetas de humanos e equinos, contrariando a citação de Pintado et al. (1995) que presumiram semelhança entre as duas espécies.

A comparação da prevenção da agregação de plaquetas de equinos entre bloqueadores de receptores e os diferentes fármacos não esteroidais, não havia sido feita anteriormente e a explicação para os resultados ainda permanece obscura. Entretanto, sabe-se que a associação do ADP com o ácido araquidônico potencializa a agregação de plaquetas (Bourdreaux et al. 1988), o que poderia explicar a redução da agregação com o uso de drogas que bloqueiem a via das ciclo-oxigenases. Entretanto, como o Ro-438857 e o RGDS agem bloqueando receptores de membrana, à similaridade dos achados com a fenilbutazona e o ketoprofeno poderiam induzir ao pensamento de que os antiinflamatórios não esteroidais possam inibir a agregação de plaquetas, por outra via, talvez até mesmo pelo bloqueio dos receptores da membrana das plaquetas de equinos.% de agregação

A metade das concentrações tanto da fenilbutazona quanto do ketoprofeno, resultou na mesma tendência a reverter a agregação das plaquetas de equinos, porém com magnitude inferior às doses integrais. Isso compro-

va a teoria da concentração-dependente, da mesma forma que mencionaram Suquet & Leid (1983) para a aspirina. A fenilbutazona 6,4 μ M preveniu a agregação em escala menor que a fenilbutazona 12,7 μ M e o ketoprofeno 9,6 μ M, mas foi, no entanto, superior à metade das outras duas drogas avaliadas neste estudo.

O flunixin não foi capaz de reverter a agregação em nenhuma das concentrações utilizadas, de forma semelhante ao observado para o RGDS. Tanto a fenilbutazona quanto o ketoprofeno mostraram-se superiores ao flunixin meglumine em todas as concentrações utilizadas.

A mudança de forma das plaquetas já foi reportada anteriormente com o uso de ADP. O mecanismo pelo qual o ADP induz a mudança de forma, que pode ser interpretada como ativação de plaquetas, é bem conhecido e envolve mecanismos de interação celular, ativação e secreção dos constituintes de seus grânulos (Sinakos & Caen 1967, Meyers et al. 1979a, Heath et al. 1994, Rosenblum 1997).

Pode-se observar que os reagentes mais eficazes em prevenir a agregação de plaquetas de eqüinos foram a fenilbutazona 12,7 μ M, o Ro-438857 0,25mg/mL, o ketoprofeno 9,6 μ M, o RGDS 700 μ M e a fenilbutazona 6,4 μ M, nesta ordem. Quanto à reversão, a fenilbutazona 12,7 μ M foi superior a todos os demais reagentes estudados.

Apesar da diferença observada entre a agregação de plaquetas de humanos e eqüinos, os bloqueadores de receptores agem inibindo a agregação de plaquetas de eqüinos *in vitro*, de forma semelhante. A fenilbutazona e o ketoprofeno apresentaram melhores resultados na prevenção da agregação de plaquetas em eqüinos *in vitro* induzida pelo ADP, do que o flunixin-meglumine e, são superiores ao fragmento monoclonal de anticorpo Reopro utilizado em humanos. A prevenção da agregação de plaquetas com a fenilbutazona foi semelhante a dos bloqueadores de receptores de membrana Ro-438857 e RGDS. Tanto a fenilbutazona quanto o ketoprofeno são capazes tanto de prevenir quanto reverter a agregação de plaquetas *in vitro* sendo dose-dependente. Os efeitos observados *in vitro* podem não ter a mesma reprodução *in vivo* e, para se testar a eficiência destes antiinflamatórios não esteroidais em inibir e reverter a agregação de plaquetas, minimizando as conseqüências dos quadros de hipercoagulabilidade e da trombose, se fazem necessários maiores estudos *in vivo*.

Agradecimentos.- Ao CNPq/DAAD e ao Instituto de Anatomia da Ludwig-Maximilians-Universität München, ao Marcolab por terem concedido a bolsa de estudos e viabilizarem a execução do experimento em suas dependências, respectivamente.

REFERÊNCIAS

Ablett J.M., Fairbairn S.M., Page C.P. & Cunningham F.M. 1997. Influence of antigen challenge on platelet responsiveness in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet. J.* 29:382-386.

- Bourdreaux M.K., Mann C.W. & Purohit R. 1988. Platelet function testing in the pony. *Lab. Anim. Sci.* 38:448-251.
- Calkins J., Lane K.P., LoSasso B. & Thurber L.E. 1974. Comparative study of platelet aggregation in various species. *J. Med.* 5:292-296.
- Dvorak H.R., Colman J.H. & Marder M. 1994. Abnormalities of hemostasis in malignant disease: Basic principles and clinical practice anonymous hemostasis and thrombosis. *Basic Principles Clin. Pract.* s/n:258-263.
- Goetz T.E. 1989. The treatment of laminitis in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 5:73-107.
- Heath M.F., Evans R.J., Poole A.W., Hayes L.J., McEvoy R.J. & Littler R.M. 1994. The effects of aspirin and paracetamol on the aggregation of equine blood platelets. *J. Vet. Pharm. Therap.* 17:374-378.
- Jarvis G.E. & Evans R.J. 1994. Endotoxin induced platelet aggregation in heparinised equine whole blood *in vitro*. *Res. Vet. Sci.* 57:317-24.
- Meyers K.M., Lindner C. & Grant B. 1979a. Characterization of the equine platelet aggregation response. *Am. J. Vet. Res.* 40:260-264.
- Meyers K.M., Lindner C. & Grant B. 1979b. Phenylbutazone inhibition of equine platelet function. *Am. J. Vet. Res.* 40:265-270.
- Miranti C.K. & Brugge J.S. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4:83-90.
- Nyarko K.A., Coomber B.L., Mellors A. & Gentry P.A. 1998. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet. Microbiol.* 61:81-91.
- Pintado C.O., Friend M. & Llanes D. 1995. Characterization of a membrane receptor on ruminants and equine platelets and peripheral blood leukocytes similar to the human integrin receptor glycoprotein IIb/IIIa (CD41/61). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44:359-368.
- Reininger A., Korndörfer M.A. & Wurzinger L.J. 1998. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow *in vitro* is mediated by integrin α IIb β 3. *Thromb. Haemost.* 70:998-1003.
- Rosenblum W.I. 1997. Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *J. Vasc. Res.* 34:409-417.
- Schwartz M.A. & Ginsberg M.H. 2002. Networks and crosstalk: integrin signaling spreads. *Nature Cell Biol.* 4:65-68.
- Sinakos Z. & Caen J.P. 1967. Platelets aggregation in mammals (humans, rat, rabbit, guinea-pig, horse, dog) a comparative study. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 17:99-111.
- Suquet C. & Leid R.W. 1983. Aggregation of equine platelets by PAF. *Inflammation* 7:197-203.
- Weiss D.J., Evanson O.A. & Wells R.E. 1997b. Evaluation of arginine-glycine-aspartate containing peptides as inhibitors of equine platelet function. *Am. J. Vet. Res.* 5:457-460.
- Weiss D.J., Evanson O.A., McClenahan D., Fagliari J.J. & Jenkins K. 1997a. Evaluation of platelets activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.* 58:1376-1380.
- Weiss D.J., Monreal L., Angles A.M. & Monasterio J. 1996. Evaluation of thrombin-antithrombin complexes and fibrin fragment D in carbohydrate induced acute laminitis. *Res. Vet. Sci.* 61:157-159.
- Wurzinger L.J. & Schmid-Schönbein H. 1985. Shear induced platelet activation: A critical reappraisal. *Biorheology* 22:399-413.
- Wurzinger L.J. & Schmid-Schönbein H. 1990. The role of fluid dynamics in triggering and amplifying haemostatic reactions in thrombogenesis. *Blood Flow in Large Arteries.* 15:215-226.
- Wurzinger L.J. 1990. Histophysiology of the circulating platelet. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 120:1-96.