

Stephanie Milis Syracuse

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS ISOLADOS DA
ALGA MARINHA *Dictyopterus jolyana* SOBRE A AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na Área de Concentração Fármaco-Medicamentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Syracuse, Stephanie Milis
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS ISOLADOS DA
ALGA MARINHA *Dictyopteris jolyana* SOBRE A AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA / Stephanie Milis Syracuse ;
orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes, 2018.
102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. hemostasia. 3. agregação
plaquetária. 4. compostos marinhos . 5.
Dictyopteris jolyana. I. Moraes, Ana Carolina
Rabello de. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS
ISOLADOS DA ALGA MARINHA Dictyopteris
jolyana SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA”**

POR

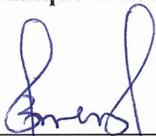
Stephanie Milis Syracuse

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

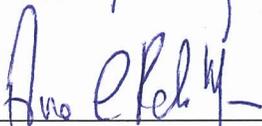
Banca Examinadora:



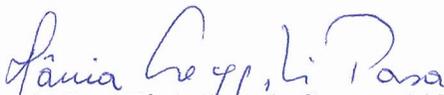
Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Beatriz Garcia Mendes Borba (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ana Carolina Rabello de Moraes (UFSC – Orientador(a))



**Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2018.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 e pelo programa de bolsas Demanda Social da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) da Universidade Federal de Santa Catarina coordenado pela Professora Doutora Maria Cláudia Santos da Silva.

AGREDECIMENTOS

Aos meus pais, Júlia e Antoine, e ao meu irmão, Nicholas que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e concluir mais essa etapa, apesar de todas as turbulências que aconteceram em nossas vidas. Agradeço pelo amor, apoio incondicional e por serem meu porto seguro durante as alegrias e me fortalecerem nos momentos difíceis.

Ao Adrisson, por toda compreensão, companheirismo, carinho e amor durante esses anos. Por todas as conversas sobre o mundo e por ser a minha paz no fim de cada dia. Por me ensinar que existem períodos na vida nos quais temos apenas que semear e ser pacientes até o momento da colheita dos frutos da nossa dedicação. Tenho muita sorte de compartilhar a vida (e o mundo) contigo!

À minha orientadora, Professora Dr.^a Ana Carolina Rabello de Moraes, pela dedicação, incentivo e ensinamentos durante essa jornada. Agradeço muitíssimo pela oportunidade, dividir a bancada comigo sempre que foi preciso, por vibrar a cada resultado e por me ensinar a docência e toda a sua delicadeza.

Às minhas parceiras no estudo da homeostasia Nathalia, Bianca, Maria Luiza e Rubia, por toda a ajuda na coleta de amostras e amizade. Vocês foram indispensáveis. A todos os meus colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, por terem me acolhido com tanto carinho, pelo auxílio nos experimentos e, principalmente, pelas risadas e amizade! À Professora Dr.^a Maria Cláudia Santos Silva, pela disponibilidade do laboratório e pelos ensinamentos durante o desenvolvimento desse trabalho.

À chefia e aos funcionários do Banco de Sangue do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago que sempre foram muito solícitos na coleta de amostras dos doadores e fizeram com que esse trabalho fosse possível.

À Professora Dr.^a Miriam de Barcellos Falkenberg, às doutorandas Gabriele Andressa Zatelli e Ana Claudia Philippus que aceitaram realizar essa parceria e colaborar com esse trabalho. Agradeço pela disponibilidade de sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por permitirem e subsidiarem a realização deste trabalho.

Esse trabalho só foi concretizado com o apoio de cada um de vocês. Muito obrigada!

*“Só os que se arriscam a ir longe demais são
capazes de descobrir o quão longe se pode ir”*

(T. S. Elliot)

RESUMO

A trombose é um importante problema de saúde pública, uma vez que apresenta elevada incidência, morbidade e mortalidade. Os eventos trombóticos podem ser prevenidos e tratados com medicamentos antiagregantes ou anticoagulantes, no entanto, essas terapias têm limitações associadas, o que restringe o seu uso em algumas situações. Nesse contexto, os produtos naturais são uma área de interesse hoje e o ambiente marinho representa uma fonte de novas moléculas bioativas. Portanto, aqueles compostos que apresentam ação sobre a hemostasia humana sem quase nenhum potencial citotóxico podem representar um avanço no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos e anticoagulantes, e auxiliar no tratamento e prevenção de eventos tromboembólicos. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito sobre a hemostasia de um extrato bruto (EDJ), cinco frações (FDJ1-5) e dois compostos isolados (IDJ1-2) provenientes da alga marinha parda *Dictyopterus jolyana*. A atividade sobre a coagulação foi avaliada pelos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A ação antiagregante foi avaliada por turbidimetria utilizando-se ADP, epinefrina, ácido araquidônico (AA), colágeno ou fator de ativação plaquetária (PAF) como agonistas. Previamente à realização dos ensaios, as amostras de plasma pobre ou rico em plaquetas foram incubadas a 37 °C com EDJ, FDJ1-5, IDJ1-2 ou o veículo de dissolução (DMSO). EDJ não apresentou atividade anticoagulante significativa. No entanto, EDJ promoveu inibição significativa da agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina, e foi capaz de reverter parcialmente a primeira onda de agregação induzida por ADP. As frações e os compostos isolados também inibiram significativamente a agregação plaquetária. O composto IDJ1 teve CI50 de $441,5 \pm 4,8 \mu\text{M}$ para ADP, $407,3 \pm 7,0 \mu\text{M}$ para epinefrina, $319,2 \pm 7,5 \mu\text{M}$ para colágeno e $410,4 \pm 6,7 \mu\text{M}$ para PAF. IDJ2 apresentou menor atividade antiagregante, com CI50 de $476,1 \pm 13,8 \mu\text{M}$ para epinefrina e maior que $500 \mu\text{M}$ para os demais agonistas. Os perfis das curvas de agregação indicam que o efeito inibitório de IDJ1 e IDJ2 está associado à inibição da segunda onda de agregação, o que sugere que IDJ1-2 estejam inibindo a ativação plaquetária através da inibição do receptor de ADP do tipo P2Y12 e de suas vias de sinalização. O efeito de IDJ1-2 sobre a ativação plaquetária foi avaliado por citometria de fluxo através da expressão de PAC1 e da expressão membranar de P-selectina. Os

compostos IDJ1-2 inibiram em mais de 50 % a expressão desses marcadores, comprovando que sua atividade está relacionada com a inibição da ativação plaquetária. O efeito citotóxico de IDJ1-2 foi avaliado pelo teste de hemólise e efeito na viabilidade de células mononucleares saudáveis. IDJ1-2 causaram pequena hemólise e citotoxicidade significativa, contudo ao compará-los com fármacos de referência, conclui-se que esses resultados não inviabilizam futuros testes in vivo. Estudos in silico predizem que IDJ1-2 possuem potencial de biodisponibilidade oral segundo a “regra dos cinco” proposta por Lipinski. A compilação dos resultados evidencia a utilização de moléculas provenientes de *D. jolyana* como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

Palavras-chave: hemostasia, agregação plaquetária, compostos marinhos, *Dictyopterus jolyana*

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE EFFECT OF ISOLATED COMPOUNDS OF SEAWEED *Dictyopteris jolyana* ON PLATELET AGGREGATION

Thrombosis is an important public health problem, due to its high incidence, morbidity and mortality. Thrombotic events can be prevented and treated with antiplatelet medications or anticoagulants, however, these therapies have associated limitations, which restricts their use in some situations. In this context, natural products are an area of interest today and the marine environment represents a source of new bioactive molecules. Therefore, those compounds that act on human hemostasis with low cytotoxic potential can represent an advance in the development of new antithrombotic drugs and anticoagulants, and help in the treatment and prevention of thromboembolic events. The aim of this work was to investigate the effect on hemostasis of a crude extract (EDJ), five fractions (FDJ1-5) and two isolated compounds (IDJ1-2) from the brown seaweed *Dictyopteris jolyana*. Clotting activity was assessed by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). The antiplatelet activity was evaluated by turbidimetry using ADP, epinephrine, arachidonic acid (AA), collagen or platelet activation factor (PAF) as agonists. Prior to the assays, samples of poor or platelet-rich plasma were incubated at 37 °C with EDJ, FDJ1-5, IDJ1-2 or the dissolution vehicle (DMSO). EDJ did not present significant anticoagulant activity. However, EDJ promoted significant inhibition of platelet aggregation induced by ADP and epinephrine, and was able to partially reverse the first wave of ADP-induced aggregation. Fractions and isolated compounds also significantly inhibited aggregation. Compound IDJ1 had IC₅₀ of 441.5 ± 4.8 μM for ADP, 407.3 ± 7.0 μM for epinephrine, 319.2 ± 7.5 μM for collagen and 410.4 ± 6.7 μM for PAF. IDJ2 presented lower antiplatelet activity, with IC₅₀ of 476.1 ± 13.8 μM for epinephrine and greater than 500 μM for the other agonists. The aggregation curve profiles suggest that the inhibitory effect of IDJ1 and IDJ2 is associated with inhibition of the second wave of aggregation, which suggests that IDJ1-2 is inhibiting platelet activation through inhibition of the P2Y₁₂-type ADP receptor and its pathways signaling. The effect of IDJ1-2 on platelet activation was assessed by flow cytometry through expression of PAC1 and membrane expression of P-selectin. IDJ1-2 compounds inhibited the expression of markers by more than 50 %, proving that their activity is related to the inhibition of platelet

activation. The cytotoxic effect of IDJ1-2 was assessed by the hemolysis test and effect on viability of healthy mononuclear cells. IDJ1-2 caused small hemolysis and significant cytotoxicity, however when comparing with reference drugs, it was concluded that these results do not impair future in vivo testing. In silico studies predict that IDJ1-2 possesses oral bioavailability potential according to the "rule of five" proposed by Lipinski. The compilation of the results shows the potential use of molecules from *D. jolyana* as prototypes in the development of new antithrombotic drugs.

Keywords: hemostasis, platelet aggregation, marine compounds, *Dictyopteris jolyana*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura plaquetária _____	34
Figura 2 - Envolvimento de múltiplas interações receptor-ligante na hemostasia primária _____	35
Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária _____	36
Figura 4 - Interações plaqueta-plaqueta na agregação plaquetária ____	40
Figura 5 - Representação esquemática do modelo clássico da cascata de coagulação _____	41
Figura 6 - Representação esquemática do sistema fibrinolítico _____	42
Figura 7 - Representação esquemática da avaliação da agregação plaquetária _____	44
Figura 8 - Estruturas propostas para os compostos isolados de <i>Dictyopteris jolyana</i> _____	49
Figura 9 - <i>Dot-plots</i> e histogramas representativos da análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo _____	55
Figura 10 - Efeito do extrato bruto de <i>D. jolyana</i> sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina _____	60
Figura 11 - Efeito das frações FDJ1, FDJ2, FDJ3, FDJ4 e FDJ5 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina _____	61
Figura 12 - Efeito de IDJ1 e IDJ2 no perfil de agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF _____	64
Figura 13 - Curvas de agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF em função da concentração de IDJ1 e IDJ2 _____	66
Figura 14 - Efeito de IDJ1 e IDJ2 na expressão membrar da GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e de P-selectina (CD62P) em plaquetas estimulados por ADP e epinefrina _____	68
Figura 15 - Efeito hemolítico de IDJ1 e IDJ2 _____	69
Figura 16 - Efeito citotóxico de IDJ1 (500 µM) e IDJ2 (500 µM) sobre células mononucleadas de indivíduos clinicamente saudáveis _____	70

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de inibição a partir da Intensidade de Fluorescência Média (IFM)	52
Equação 2 - Cálculo da taxa de hemólise	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Efeito do extrato bruto de *D. jolyana* (EDJ) sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) _59
- Tabela 2** - Efeito de IDJ1 e IDJ2 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF _____ 62
- Tabela 3** - Concentrações inibitórias de 50 % (CI₅₀) da agregação plaquetária de IDJ1 e IDJ2 _____ 65
- Tabela 4** - Porcentagem de inibição calculada da expressão de PAC1 e de CD62P _____ 67
- Tabela 5** - Propriedades estruturais de IDJ1, IDJ2, AAS e clopidogrel calculadas utilizando a plataforma Molinspiration Cheminformatics __ 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SUS	Sistema Único de Saúde
AAS	Ácido Acetilsalicílico
FXa	Fator Xa
ADP	Difosfato de Adenosina
AA	Ácido Araquidônico
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
CI50	Concentração Inibitória 50 %
CD62P	P-selectina
PAC1	GpIIb/IIIa ativada
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Gp	Glicoproteína
ATP	Trifosfato de Adenosina
FvW	Fator de von Willebrand
Ca⁺²	Íon Cálcio
TXA2	Tromboxano A2
PIP2	Fosfatidilinositol 4-bifosfato
IP3	Trifosfato de Inositol
PLC	Fosfolipase C
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína Quinase C
PI3K	Fosfoinositídeo 3 Quinase
AC	Adenilato Ciclase
PLA2	Fosfolipase A ₂
COX1	Ciclooxigenase 1
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PSGL-1	Glicoproteína 1 Ligante de P-selectina
FT	Fator Tecidual
FVII	Fator VII
CCB	Centro de Ciências Biológicas
EDJ	Extrato Bruto de <i>Dictyopterus jolyana</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

EUA	Estados Unidos da América
FDJ	Fração do Extrato Bruto de <i>Dictyopteris jolyana</i>
PBS	Tampão Fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês Fluorescein Isothiocyanate
PE	Ficoeritina, do inglês Phycoerythrin
PercP	Complexo Proteína Piridina de Clorofila, do inglês Peridinin Chlorophyll Protein Complex
FSC	Padrão de Dispersão Frontal
SSC	Padrão de Dispersão Lateral
IFM	Intensidade de Fluorescência Média
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
MM	Massa Molecular
nON	Número de Grupamentos Aceptores de Ligação de Hidrogênio
nOHNH	Número de Grupamentos Doadores de Ligação de Hidrogênio
N rotb	Número de Ligações Rotativas
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
HU	Hospital Universitário
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
TP	Tempo de Protrombina
TTPa	Tromboplastina Parcial Ativada
TAF-1	Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina
PAI-1	Inibidor-1 do Ativador de Plasminogênio
PDF	Produtos de Degradação de Fibrinogênio/Fibrina
tPA	Ativador de Plasminogênio Tecidual

F1a	Fibrina
F1	Fibrinogênio
F11a	Trombina
F11	Protrombina
FVa	Fator V Ativado
FVIIIa	Fator VIII Ativado
FVIIa	Fator VII Ativado
FIXa	Fator IX Ativado
FXIIa	Fator XII Ativado
FXIa	Fator XI Ativado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 HEMOSTASIA	33
3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA	33
3.2.1 Adesão Plaquetária	35
3.2.2 Ativação Plaquetária	36
3.2.3 Secreção Plaquetária	38
3.2.4 Agregação Plaquetária	39
3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA	40
3.4 FIBRINÓLISE	42
3.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASIA	43
3.6 TROMBOSE	45
3.7 COMPOSTOS NATURAIS	45
4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA	47
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	47
4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DAS AMOSTRAS	47
4.3 EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS	47
4.3.1 Extrato bruto de <i>Dictyoteris jolyana</i>	47
4.3.2 Frações isoladas do extrato bruto de <i>Dictyopteris jolyana</i>	48
4.3.3 Compostos isolados de <i>Dictyopteris jolyana</i>	48
4.4 ESTUDOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	49
4.5 ESTUDOS DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	50
4.5.1 Determinação de CI_{50} de compostos isolados	50
4.6 EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GPIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA	51
4.7 TESTE DE HEMÓLISE	56
4.8 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>D. jolyana</i> EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS	57
4.9 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>D. jolyana</i>	58
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5 RESULTADOS	59
5.1 ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO DE <i>D. jolyana</i> (EDJ) SOBRE A HEMOSTASIA	59

5.2 ATIVIDADE DAS FRAÇÕES FDJ1, FDJ2, FDJ3, FDJ4 e FDJ5 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA _____	61
5.3 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS ISOLADOS IDJ1 E IDJ2 _____	61
5.3.1 Efeito de IDJ1 e IDJ2 sobre a agregação plaquetária _____	62
5.3.2 Determinação de CI_{50} de IDJ1 e IDJ2 _____	65
5.3.3 Ação de IDJ1 e IDJ2 sobre a expressão membranar da GpIIb/IIIa ativada e de P-selectina _____	67
5.3.4 Avaliação de hemocompatibilidade de IDJ1 e IDJ2 pelo teste de hemólise _____	69
5.3.5 Efeito de IDJ1 e IDJ2 em células mononucleares de indivíduos cl clinicamente saudáveis _____	69
5.3.6 Predição da biodisponibilidade oral de IDJ1 e IDJ2 _____	70
6 DISCUSSÃO _____	73
7 CONCLUSÕES _____	83
8 PERSPECTIVAS _____	85
REFERÊNCIAS _____	87
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Seres Humanos _____	97
ANEXO B - Trabalhos Apresentados em Congressos _____	101

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um mecanismo fisiológico complexo que envolve o equilíbrio entre as plaquetas e os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Uma de suas funções é manter o sangue em estado fluido durante a circulação nos vasos sanguíneos e evitar sangramentos ao interromper a perda sanguínea decorrente de uma lesão vascular (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; REZENDE, 2010).

Diante de um dano vascular, as plaquetas aderem ao sítio da lesão, são ativadas e formam o tampão hemostático primário que, posteriormente, é estabilizado por fibras de fibrina como consequência da ativação do sistema de coagulação. Após a cicatrização da lesão e regeneração do tecido, o coágulo de fibrina dissolve-se e o fluxo sanguíneo é restaurado (LESLIE, 2010; VERSTEEG et al., 2013).

Quando algum dos mecanismos hemostáticos falha devido a anormalidades genéticas ou adquiridas, pode resultar em um evento hemorrágico ou complicações tromboembólicas (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009). Na visão clássica sobre eventos trombóticos, as plaquetas têm um papel fundamental na trombose arterial, em contrapartida, a trombose venosa relaciona-se com distúrbios da coagulação plasmática. No entanto, a aterosclerose e a trombose estão relacionadas e compartilham riscos comuns (MONTORO-GARCIA et al., 2016). No decorrer dos últimos anos, as doenças cardiovasculares têm se tornado uma das principais causas de óbito e exigem um alto gasto para o Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro entre internações e tratamento dos pacientes (BRASIL, 2015). A elevada incidência, morbidade e mortalidade de eventos tromboembólicos e de suas complicações, associado ao seu elevado custo para o SUS, faz com que esses eventos sejam considerados um problema de saúde pública de grande importância (WEITZ; EIKELBOOM, 2016).

Atualmente, os eventos trombóticos podem ser prevenidos e tratados com medicamentos antiagregantes ou anticoagulantes. Dentre eles, destacam-se os antiplaquetários, onde se incluem o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel, e os medicamentos anticoagulantes, como os antagonistas da vitamina K e os inibidores indiretos do fator Xa (FXa). No entanto, essas terapias têm limitações associadas, como uma janela terapêutica estreita, interações medicamentosas e alimentares importantes, plaquetopenia, e necessidade de monitorização laboratorial frequente. Portanto, a busca por novos fármacos antitrombóticos e anticoagulantes mais seguros, eficazes, com

melhor custo-benefício e de simples monitorização laboratorial ainda se faz necessária (KIM et al., 2010; SURIN et al., 2010; BAGLIN, 2013).

No contexto da hemostasia, a busca por agentes antitrombóticos e anticoagulantes em produtos naturais representa uma área de grande interesse hoje. O ambiente marinho abrange uma série de organismos cujo desenvolvimento de habilidades metabólicas para garantia de sua sobrevivência em habitats diversos e hostis resultou na biossíntese de uma série de metabólitos com estruturas químicas únicas, e por vezes sem precedentes no ambiente terrestre, que desempenham uma vasta gama de atividades específicas (MARTINS et al., 2014).

Alguns destes metabólitos também apresentam atividades farmacológicas, como antiofídica (DOMINGOS et al., 2011), citotóxica (AZEVEDO et al., 2008), anti-inflamatória, antiangiogênica (CUMASHI et al., 2007), anticoagulante (MOURA et al., 2011) entre outras, o que reforça seu potencial como fonte de novos compostos com atividades biológicas. Desta forma, moléculas bioativas de origem marinha têm sido amplamente estudadas quanto às suas atividades sobre as plaquetas e sobre a coagulação, na procura por novos protótipos para o desenvolvimento de terapias antitrombóticas (MARTINS et al., 2014). De fato, os produtos naturais são fontes de novos agentes terapêuticos e nos últimos anos uma grande quantidade de compostos tem sido aprovada para ser utilizada em várias áreas, desde quimioterápicos a cosméticos (CATALANI et al., 2016; KHALID et al., 2016).

Portanto, aqueles compostos de origem natural capazes de apontar uma boa ação sobre a hemostasia humana podem representar um importante avanço em direção ao desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos e anticoagulantes que auxiliem no tratamento e prevenção de eventos tromboembólicos na população em geral (LI et al., 2012; KU et al., 2013). Diante disso, um dos objetivos do presente estudo é verificar a atividade sobre a hemostasia do extrato bruto, frações e compostos isolados da alga marinha parda *Dictyopterus jolyana*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de compostos de origem natural, na forma de extrato bruto, frações e compostos isolados provenientes de algas da espécie *Dictyopteris jolyana*, sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação de extrato bruto de algas da espécie *D. jolyana* sobre a via extrínseca e intrínseca da coagulação sanguínea;
- Estudar o efeito de extratos brutos de algas da espécie *D. jolyana* sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP) e epinefrina;
- Verificar a ação das frações obtidas a partir do extrato bruto de *D. jolyana* sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina;
- Selecionar as frações com melhor atividade antiagregante e verificar a ação de seus compostos isolados sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, ácido araquidônico (AA), colágeno e fator de ativação plaquetária (PAF);
- Determinar a concentração inibitória 50 % (CI₅₀) dos compostos isolados de *D. jolyana* frente à agregação induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF;
- Investigar o efeito dos compostos isolados de *D. jolyana* sobre a ativação plaquetária através da avaliação da expressão membranar de GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e de P-selectina (CD62P);
- Verificar se os compostos isolados de *D. jolyana* propiciam hemólise de eritrócitos humanos saudáveis;
- Verificar se os compostos isolados de *D. jolyana* possuem efeito citotóxico em células mononucleadas humanas saudáveis;
- Realizar a estipulação teórica da solubilidade e permeabilidade dos compostos isolados de *D. jolyana* utilizando modelos computacionais, de acordo com alguns parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski e colaboradores (2001).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HEMOSTASIA

O sistema hemostático envolve o equilíbrio entre as plaquetas e os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Uma de suas funções é manter o sangue em estado fluido durante a circulação nos vasos sanguíneos e evitar sangramentos ao interromper a perda sanguínea decorrente de uma lesão vascular (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; REZENDE, 2010; VERSTEEG et al., 2013).

O sangue em estado fluido circula através da vasculatura no sistema circulatório. Quando há lesão vascular, forma-se rapidamente um tampão hemostático no local para minimizar a perda de sangue pelo endotélio lesado. A porção sanguínea plasmática é rica em proteínas solúveis que atuam de forma conjunta em uma cascata de eventos que culmina na formação de um coágulo de fibrina (SMITH et al., 2015).

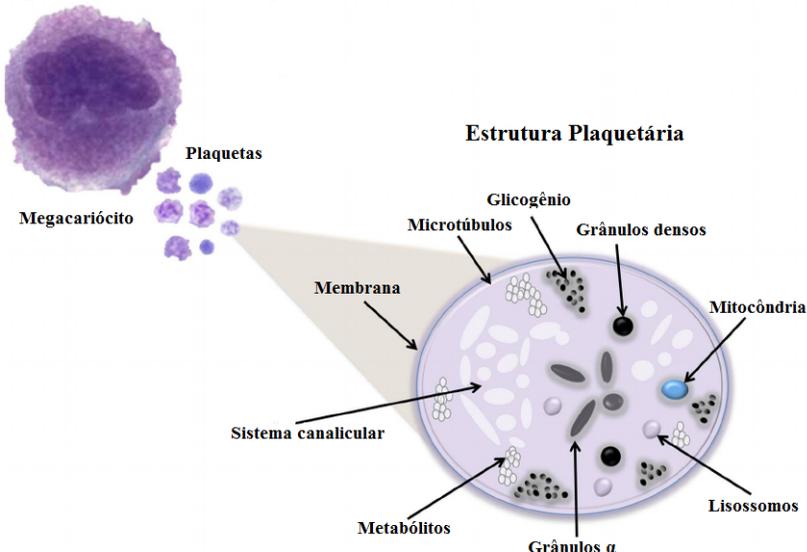
Estudos apontam que os mecanismos hemostáticos atuam de forma dinâmica e interligada, envolvendo interações rápidas e complexas entre a resposta plaquetária, proteínas da coagulação e a parede vascular (LESLIE, 2010; VERSTEEG et al., 2013). No entanto, para fins de estudo, a hemostasia pode ser dividida didaticamente em hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise. A hemostasia primária engloba as interações entre as plaquetas e as paredes dos vasos sanguíneos. Nessa etapa, a ativação das plaquetas ocorre após a exposição de componentes da parede lesada, seguida pela adesão ao endotélio e a formação de um tampão hemostático com a agregação plaquetária. A hemostasia secundária envolve fatores teciduais e plasmáticos, que iniciam a cascata de coagulação, o que culmina com a geração de trombina (KE; HUANG, 2016). A última etapa da hemostasia ocorre com o mecanismo de fibrinólise, que envolve a degradação da fibrina e a dissolução do coágulo formado na circulação, restaurando a circulação sanguínea local e prevenindo complicações tromboembólicas (VERSTEEG et al., 2013).

3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA

No corpo humano adulto, circulam 1×10^{12} plaquetas de forma contínua em 1.000 m^2 de superfície vascular com adesão e agregação mínimas. As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são fragmentos citoplasmáticos anucleados, formados como resultado de endomitoses de megacariócitos em resposta à trombopoetina. Após a

saída da medula óssea, as plaquetas circulam por cerca de 10 dias na corrente sanguínea e depois são retiradas da circulação e destruídas no baço e no fígado. Quando em repouso, as plaquetas apresentam forma discoidal com diâmetro de 2-3 μm e seu volume médio é de 7 μm^3 . Elas possuem um sistema interno complexo de microtúbulos e citoesqueleto de actina, responsáveis pela mudança conformacional após o processo de ativação da plaqueta. A membrana plaquetária é uma bicamada fosfolipídica que expressa vários receptores de superfície, dentre eles estão os receptores acoplados à proteína G (GPCR) e glicoproteínas (Gp), como a glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa). A plaqueta também possui um sistema canalicular aberto que começa na membrana plasmática e permite o intercâmbio de substâncias entre os compartimentos extra e intracelular. Esse sistema tubular denso sequestra íons cálcio (Ca^{2+}), liberando-os na ativação plaquetária. Adicionalmente, o citoplasma plaquetário contém mitocôndrias e grânulos, denominados corpúsculos densos, grânulos- α e lisossomos. As mitocôndrias agem na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), essencial para o funcionamento da plaqueta. O glicogênio é encontrado no endoplasma plaquetário, e é onde o material de reserva ou fonte de energia da plaqueta fica armazenado (Figura 1) (CIMMINO; GOLINO, 2013; VERSTEEG et al., 2013; GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

Figura 1 - Estrutura plaquetária.



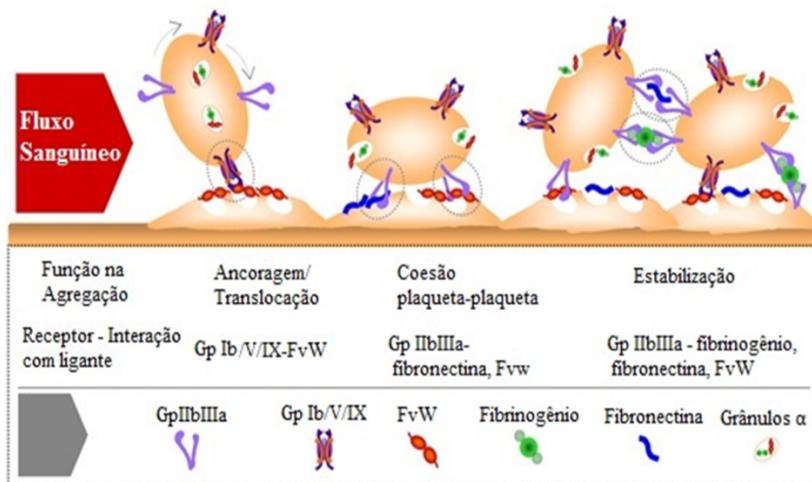
Fonte: Adaptado de (ZAPATA; COX; SALVATO, 2014)

Em condições fisiológicas, as plaquetas não interagem com o endotélio, porém, após ocorrer lesão vascular, elas respondem rapidamente às propriedades trombogênicas das células endoteliais, e formam o trombo plaquetário. A primeira camada de plaquetas liga-se ao endotélio através do estágio inicial de adesão, enquanto que o subsequente crescimento do trombo depende da ativação, secreção e agregação plaquetária (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

3.2.1 Adesão plaquetária

A adesão inicial das plaquetas aos locais de lesão vascular é mediada por diversas glicoproteínas de membrana. A GpIb/V/IX é um receptor único de estrutura complexa, cujo principal componente é a GpIb, pois ele é responsável pelo contato indireto com a parede do vaso através da interposição do fator de von Willebrand (FvW) (Figura 2). A ausência ou deficiência de GpIb ou FvW causam defeitos expressivos na hemostasia. As GpIV, GpIa/IIa e GpVI são receptores de colágeno numerosos que estão na superfície das plaquetas e ligam-se diretamente ao colágeno exposto na lesão vascular. Além disso, assim como a GpIb, essas Gp também podem se ligar indiretamente à parede vascular (WALLE et al., 2005; CIMMINO GOLINO, 2013).

Figura 2 - Envolvimento de múltiplas interações receptor-ligante na hemostasia primária.



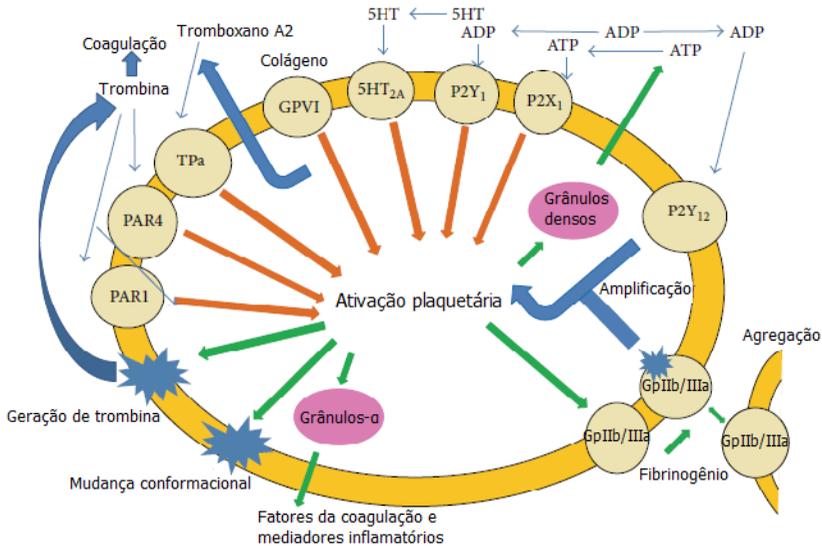
Gp - glicoproteína; FvW - fator de von Willebrand.

Fonte: Adaptado de (JACKSON, 2007).

3.2.2 Ativação plaquetária

O processo de adesão plaquetária é capaz de, por si só, causar a ativação das plaquetas. A ativação plaquetária também pode ser iniciada pela ligação de agonistas a receptores específicos da membrana externa da plaqueta (Figura 3). Alguns dos agonistas plaquetários mais importantes são o difosfato de adenosina, a epinefrina, o fator de ativação plaquetária, a trombina, o colágeno e o tromboxano A2 (TXA2). O ADP e a epinefrina são agonistas solúveis liberados após a secreção do conteúdo granular das plaquetas. Determinados agonistas, como o PAF e o colágeno, são liberados pelo rompimento do endotélio e exposição do subendotélio, enquanto outros agonistas, como o TXA2, são liberados pelas plaquetas que foram ativadas pelo processo de adesão (KICKLER, 2006).

Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária.



GPVI - glicoproteína VI; GpIIb/IIIa - glicoproteína IIb/IIIa; ADP - difosfato de adenosina; ATP - trifosfato de adenosina; 5HT - serotonina.

Fonte: Adaptado de (BHATTACHARYYA, 2014).

O ADP é um agonista de função fundamental na agregação plaquetária, pois uma vez secretado, amplifica a ativação induzida por outros agonistas. O ADP possui três receptores principais na superfície membrana: P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁. O receptor P2Y₁ é acoplado à proteína

G_q e, uma vez estimulado pelo ADP, é capaz de ativar a fosfolipase C (PLC). A PLC hidrolisa o fosfatidilinositol 4-bisfosfato (PIP₂), um fosfolípido de membrana, gerando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP₃). O IP₃ promove o aumento transitório da concentração intracelular de Ca^{2+} , ativando o sistema contrátil actina-miosina, o que ocasiona modificações do citoesqueleto, extensão de filopódios, e mudança do formato da plaqueta de discoidal para esférico (KROLL; SCHAFFER, 1995; ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; BROOS et al., 2011). Já o DAG é responsável pela ativação da proteína quinase C (PKC), que realiza a fosforilação de diversos substratos, contribuindo para a secreção do conteúdo granular plaquetário (KROLL; SCHAFFER, 1995; ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010). Em resumo, a ativação do P₂Y₁ causa uma efêmera modificação da mobilização intracelular de Ca^{2+} , do formato da plaqueta e da secreção plaquetária, o que resulta em uma fraca e passageira agregação plaquetária (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010). Uma agregação plaquetária estável e firme requer a ligação do ADP ao receptor P₂Y₁₂, que é acoplado à proteína G_i . A ativação do P₂Y₁₂ inibe a adenilato ciclase (AC) e ativa a fosfoinositídeo 3 quinase (PI3K), o que causa a amplificação do sinal de agregação, inclusive da agregação iniciada por outros agonistas, e a ativação da GpII/bIIIa. A coativação de ambos os receptores, P₂Y₁ e P₂Y₁₂, é imprescindível para a agregação induzida por ADP, uma vez que a inibição seletiva de um desses receptores resulta em diminuição significativa da agregação. Já o receptor P₂X₁ é um canal iônico envolvido no rápido influxo de Ca^{2+} extracelular, o que conduz a alterações de forma da plaqueta, mas não a sua ativação (JIN; KUNUPULI, 1998; ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; CIMMINO; GOLINO, 2013).

A resposta plaquetária por ação da epinefrina é mediada pela proteína G_i , através de receptores α_2 -adrenérgicos. A epinefrina causa influxo de Ca^{2+} , o que estimula a fosfolipase A₂ (PLA₂) a hidrolisar fosfolípidos da membrana plaquetária, principalmente a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, liberando assim ácido araquidônico (AA). O AA liberado é então substrato para a enzima cicloxigenase 1 (COX1), que desencadeia a síntese de prostaglandinas. A enzima tromboxano sintetase age sobre essas prostaglandinas, produzindo TXA₂. O TXA₂ sintetizado é secretado pelas plaquetas e tem um papel importante na vasoconstrição e na ativação de outras plaquetas (amplificação de sinal), facilitando a formação do trombo. A epinefrina é considerada um agonista mais fraco que o ADP, já que não é capaz de induzir mudança conformacional nas plaquetas (BROOS, 2011).

O PAF é um eficiente agente agregante *in vivo* e *in vitro*. Produz seus efeitos estimulando o seu receptor acoplado à proteína G específico, que é expresso constitutivamente na superfície plaquetária. Assim como o ADP, o PAF ativa a via da PLC-IP₃-Ca²⁺ e inibe a AC por meio da proteína G_q e da proteína G_i, respectivamente. Ele também ativa a PLA₂, o que resulta na produção e liberação de segundos mensageiros, como TXA₂ e prostaglandinas derivadas de AA. Dessa forma, o PAF é capaz de promover mudança conformacional das plaquetas, agregação plaquetária e liberação do conteúdo granular dependente do metabolismo de AA. Esse agonista participa do sistema de amplificação e sinergismo plaquetário, pois é liberado por plaquetas ativadas e as ativa consequentemente, gerando um *loop* de ativação (CHAO; OLSON, 1993; ZIMMERMAN et al., 2002; RAMAKRISHNAN et al., 2017).

O colágeno, uma das proteínas mais abundantes da matriz subendotelial vascular, atua como um potente estímulo para adesão e agregação plaquetária quando é exposto devido a um dano vascular. A ativação induzida por colágeno pode ser subdividida em três etapas principais. Primeiro ocorre a interação das plaquetas com o complexo colágeno e FvW e seus receptores, GpIa/IIa, GpIb-IX-V e, principalmente, GPVI, o que desencadeia o aumento da concentração do íon Ca²⁺ intracelular e o metabolismo do fosfatidilinositol. Após isso, ocorre a liberação do conteúdo granular denso e a consequente exposição e ativação do receptor GpIIb/IIIa levando à ativação das plaquetas adjacentes para formação do trombo branco (NIESWANDT, 2003; SURIN et al., 2010; CIMMINO; GOLINO, 2013).

3.2.3 Secreção plaquetária

Como anteriormente mencionado, a adesão da plaqueta ao endotélio lesionado gera uma subsequente sinalização citoplasmática que promove a modificação da forma da plaqueta pela ativação do sistema contrátil actina-miosina (KROLL; SCHAFER, 1995; ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; BROOS et al., 2011). A interação entre a miosina e a actina também promove por contração a compressão dos constituintes do citosol plaquetário, inclusive dos grânulos citoplasmáticos, provocando a sua fusão com a membrana externa e, com isso, levando à secreção de substâncias ou degranulação, o que enriquece o microambiente local com uma grande quantidade de moléculas bioativas. São três as populações granulares que existem nas plaquetas: os grânulos densos, os grânulos- α e os lisossomos (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001; BROOS et al., 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013).

Os grânulos densos armazenam íons bivalentes e pequenas moléculas não proteicas, como os nucleotídeos ADP e ATP, o Ca^{2+} , a serotonina e o tromboxano, que são liberados lentamente e promovem a amplificação da ativação e agregação plaquetária (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001; CIMMINO; GOLINO, 2013).

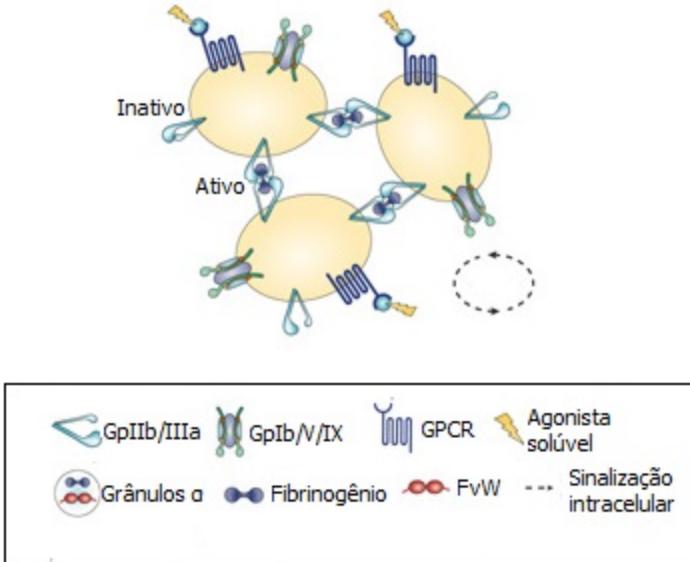
Os grânulos- α são 10 vezes mais abundantes que os grânulos densos e representam 10 % do volume total da plaqueta. Eles contêm fibrinogênio, FvW, fator 4 plaquetário, β -tromboglobulina, trombospondina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator V, bem como um estoque de GpIIb/IIIa. Os grânulos- α também armazenam proteínas adesivas em sua membrana, como a P-selectina (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001; CIMMINO; GOLINO, 2013). A P-selectina é uma glicoproteína intracelular de adesão que está presente em células endoteliais e na membrana dos grânulos- α quando a plaqueta não está ativada. Com a ativação plaquetária, a membrana do grânulo- α une-se à membrana citoplasmática e essa proteína começa a ser expressa no meio extracelular (STENBERG et al, 1985; KUTLAR; EMBURY, 2014). Também conhecida como CD62P, a P-selectina é uma molécula chave em processos inflamatórios vasculares, responsável pela interação entre plaquetas e leucócitos, nos quais seu receptor é a glicoproteína 1 ligante de P-selectina (PSGL-1). Essa interação resulta no rolamento de leucócitos pela superfície da célula endotelial e na sinalização celular de mediadores inflamatórios (FRENETTE et al., 2000; WEYRICH; LINDEMANN; ZIMMERMAN, 2003; KUTLAR; EMBURY, 2014). Dessa forma, os constituintes dos grânulos- α promovem adesão e agregação plaquetária adicionais, e auxiliam no reparo do vaso lesionado. Por fim, os lisossomos contêm hidrolases, cuja função é eliminar agregados circulantes de plaquetas (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001; CIMMINO; GOLINO, 2013).

3.2.4 Agregação plaquetária

A adesão e ativação plaquetárias são seguidas pela agregação das plaquetas. De modo geral, a ligação de agonistas, como o ADP e o PAF, aos seus receptores específicos, associado às modificações do citoesqueleto plaquetário, promovem modificações conformacionais no receptor GpIIb/IIIa. A alteração da conformação desse receptor ativa-o e aumenta a sua afinidade por moléculas de fibrinogênio (Figura 4). O fibrinogênio por sua vez é responsável por formar “pontes” entre plaquetas adjacentes e assim promover a agregação plaquetária. Outras Gps adesivas, a fibronectina e o FvW, também são capazes de interagir

com esse receptor e facilitar a formação do tampão hemostático primário (SAVAGE; ALMUS-JACOBS; RUGGERI, 1998; GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

Figura 4 - Interações plaqueta-plaqueta na agregação plaquetária.



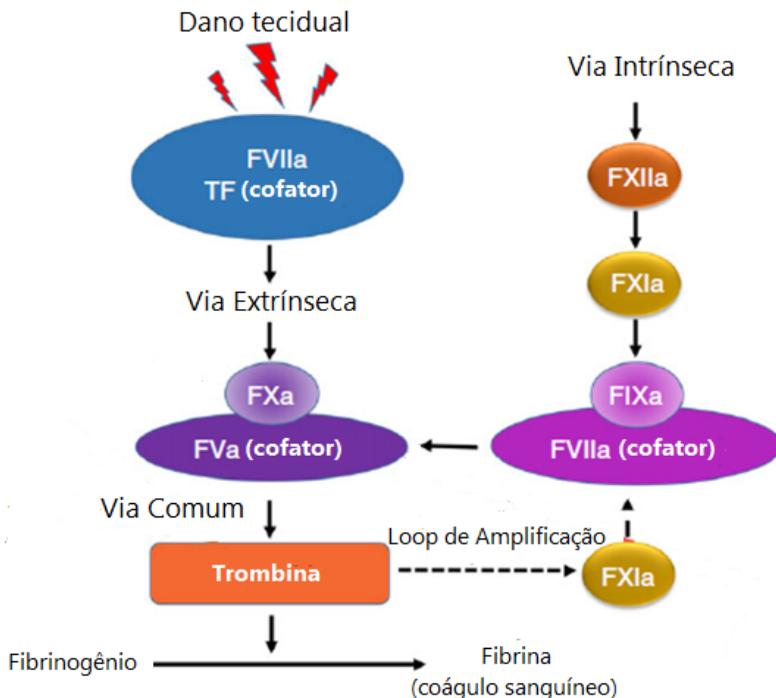
Gp - glicoproteína; GPCR - receptor acoplado a proteína G; FvW – fator de von Willebrand.

Fonte: Adaptado de (JACKSON; SCHOENWAEELDER, 2003).

3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

O equilíbrio da coagulação sanguínea é caracterizado pela ativação contínua e em cascata de fatores e a geração coordenada de complexos regulados por proteínas circulantes inibitórias. Estes complexos enzimáticos consistem em proteases, cofatores e substratos de zimogênios. Atualmente, o estudo do processo hemostático considera que há uma inter-relação entre diversos processos que atuam em uma série de estágios (modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares). No entanto, didaticamente, o estudo da hemostasia secundária pode seguir o modelo de cascata em duas vias (modelo clássico), extrínseca e intrínseca, que seguem para uma via comum (Figura 5) (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; SMITH et al., 2015).

Figura 5 - Representação esquemática do modelo clássico da cascata de coagulação.



F - fator; a - ativado; TF - fator tecidual.

Fonte: Adaptado de (LIN; BORENSZTAJN; SPE, 2017).

Qualquer que seja o evento desencadeante, o início da coagulação ocorre pela via extrínseca, dependente de fator tecidual (FT). O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas é expresso em fibroblastos e células de músculo liso subjacentes ao endotélio vascular. Dessa forma, quando há lesão endotelial ou ativação de células endoteliais ou monócitos, o FT é exposto na circulação sanguínea (FERREIRA et al., 2010). Ele liga-se ao fator VII (FVII) e ao fator VII ativado (FVIIa) presentes no sangue, e forma o complexo FVIIa/FT, que possui atividade enzimática. O complexo FVIIa/FT, também conhecido como complexo tenase extrínseco, desencadeia a ativação do fator X (FXa) que pertence a via comum e do fator IX (FIXa) que pertence a via intrínseca da coagulação. O complexo FVIIa/FT também é capaz de ativar o FVII circulante (auto-ativação), facilitando a formação do complexo

tenase extrínseco (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; FERREIRA et al., 2010).

A via intrínseca inicia-se quando o fator XII é ativado (FXIIa) ao entrar em contato com cargas elétricas negativas, como o colágeno ou endotoxinas. Uma vez ativado, o FXIIa ativa o fator XI (FXIa), que então ativa o FIX (FIXa). Nesta fase, o FIXa liga-se ao FVIII ativado (FVIIIa) que se encontra na superfície plaquetária formando o complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa), o qual também é capaz de converter o FX em FXa (SMITH et al., 2015).

O FX que foi ativado tanto pela via extrínseca quanto pela intrínseca, liga-se ao seu cofator, o fator FV ativado (FVa), formando o complexo protrombinase, que faz a conversão de protrombina (FII) em trombina (FIIa). Segundo o modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares, a trombina também é responsável pela clivagem do fibrinogênio (FI) em fibrina (FIa), as quais se polimerizam e estabilizam o tampão hemostático primário que foi formado pelas plaquetas durante a hemostasia primária (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; FERREIRA et al., 2010).

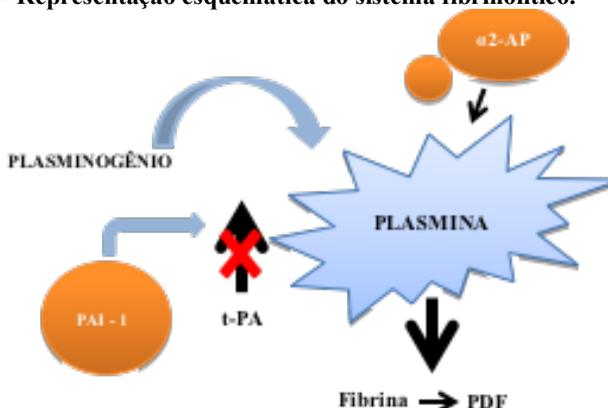
3.4 FIBRINÓLISE

Fibrinólise é o processo pelo qual a fibrina é degradada pela ação da plasmina. O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteases séricas e inibidores que regulam a conversão de plasminogênio em plasmina, uma enzima ativa que tem por função degradar fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular (FOLEY et al., 2011).

Quando ocorre a quebra da continuidade do endotélio vascular, desencadeia-se não só a cascata da coagulação, mas também a via fibrinolítica. Esta via é iniciada quando as células endoteliais do tecido lesado expõem o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) que, por sua vez, medeia a conversão de plasminogênio em plasmina. Como já mencionado, a plasmina é uma enzima proteolítica que degrada o fibrinogênio e a fibrina presentes no tampão hemostático, dando origem aos chamados produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina (PDF) (KLEINEGRIS; TEN CATE-HOEK; TEN CATE, 2012; WEITZ; EIKELBOOM, 2016). Dessa forma, o sistema fibrinolítico tem um papel importante durante a coagulação, uma vez que é responsável por “modelar” o coágulo que está sendo formado para que ele não se torne muito grande e obstrua a circulação sanguínea no vaso lesionado (ARIENS, 2013). Além disso, uma vez que o dano endotelial foi reparado, o sistema fibrinolítico é também responsável por promover a

dissolução do coágulo e restabelecer a circulação normal. Para garantir a correta dissolução dos trombos formados, a fibrinólise possui uma complexa regulação que envolve inibidores, como a $\alpha 2$ -antiplasmina e o inibidor-1 do ativador de plasminogênio (PAI-1). Outro importante regulador da fibrinólise é o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que remove os resíduos C-terminais da fibrina que são importantes para a ligação e ativação do plasminogênio (Figura 6) (KLEINEGRIS; TEN CATE-HOEK; TEN CATE, 2012; WEITZ; EIKELBOOM, 2016).

Figura 6 – Representação esquemática do sistema fibrinolítico.



PDF - produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina; $\alpha 2$ -AP - $\alpha 2$ -antiplasmina; PAI-1 - inibidor-1 do ativador de plasminogênio.

Fonte: Adaptado de (FRANCO, 2001).

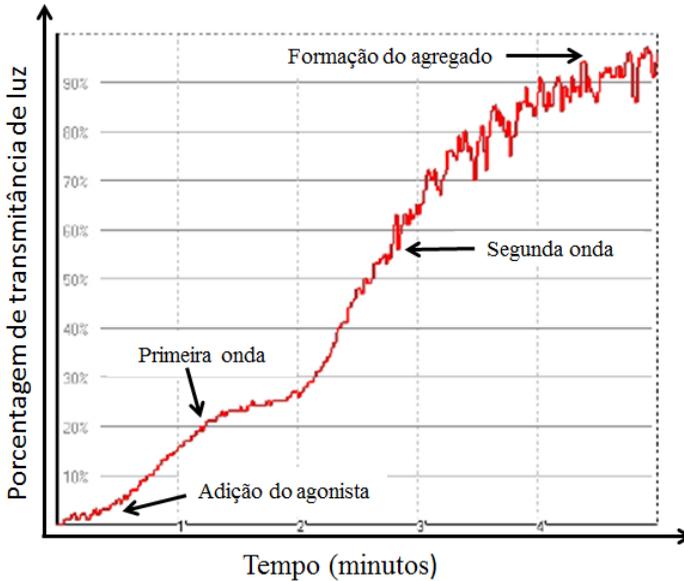
3.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASIA

A avaliação laboratorial da função plaquetária (hemostasia primária) inicia com um hemograma, em que se obtêm informações como a quantidade de plaquetas, seu tamanho e distribuição. Pacientes com trombocitopenia podem necessitar apenas de transfusões de plaquetas para aumentar a contagem de plaquetas dos pacientes. No entanto, quando se suspeitar de alterações funcionais, uma investigação mais aprofundada pode ser necessária (GURNEY, 2016).

A agregometria por transmissão de luz é uma metodologia muito utilizada para a avaliação da hemostasia primária. Essa técnica envolve a agitação de uma suspensão de plaquetas na presença de uma substância agonista solúvel, como por exemplo, ADP, epinefrina, AA e ristocetina,

e o monitoramento da agregação plaquetária da amostra diretamente relacionada às mudanças na porcentagem de transmissão de luz (JACKSON, 2007). Esse ensaio indica ativação das plaquetas frente ao estímulo empregado, referente à primeira onda observada no equipamento, seguida pela amplificação de sinal, liberação do conteúdo de grânulos e agregação plaquetária, resultando na segunda onda observada no gráfico de porcentagem de transmitância de luz (Figura 7). Estudos mais sofisticados dos aspectos funcionais das plaquetas, de seus receptores externos e do seu armazenamento de conteúdos internos podem ser realizados utilizando-se outras técnicas, como citometria de fluxo e ensaios de luminescência (GURNEY, 2016).

Figura 7 – Representação esquemática da avaliação da agregação plaquetária.



Fonte: Elaboração Própria.

Tradicionalmente, a avaliação laboratorial da coagulação sanguínea (hemostasia secundária) consiste em métodos de triagem como o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), que avalia o funcionamento da via intrínseca, e o tempo de protrombina (TP), que avalia o funcionamento da via extrínseca da coagulação. Quando os tempos de TTPa e/ou TP prolongam, significa que existem problemas na hemostasia secundária, como deficiência de fatores da coagulação ou

presença de inibidores da coagulação. Outras metodologias mais sofisticadas como a dosagem de fatores também são empregadas na avaliação da hemostasia secundária (BRASIL, 2010).

3.6 TROMBOSE

Quando algum dos mecanismos hemostáticos falha devido a anormalidades genéticas ou adquiridas, pode resultar em um evento hemorrágico ou complicações tromboembólicas (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009). Os eventos tromboembólicos são uma causa significativa de morbimortalidade, e aproximadamente um terço dos pacientes que tiveram algum desses eventos é acometido por sequelas incapacitantes. Além disso, a incidência de trombose aumenta de maneira proporcional à idade e cria uma situação de alerta para o sistema de saúde (WEITZ; EIKELBOOM, 2016). De fato, as doenças cardiovasculares tornaram-se a principal causa de óbito no decorrer dos últimos anos e representam um alto gasto para o SUS entre internações e tratamento dos pacientes (BRASIL, 2015).

A trombose ocorre quando há um desequilíbrio no processo de formação e dissolução de coágulos dentro de artérias ou veias. A trombose arterial é a causa subjacente de grande parte dos ataques cardíacos e derrames, enquanto que os trombos venosos em veias profundas podem desprender e causar tromboembolismo (WEITZ; EIKELBOOM, 2016). Na visão clássica sobre eventos trombóticos, as plaquetas têm um papel fundamental na trombose arterial, enquanto a trombose venosa relaciona-se com a coagulação plasmática. No entanto, a aterosclerose e a trombose estão relacionadas e compartilham riscos comuns e um corpo significativo de pacientes clínicos. Portanto, unem-se esforços para entender a fisiopatologia das doenças tromboembólicas e desenvolver novas terapias antiagregantes e anticoagulantes (MONTORO-GARCIA et al., 2016).

3.7 COMPOSTOS NATURAIS

Inúmeros produtos naturais originários de plantas já foram identificados, porém, segundo alguns autores, as possibilidades de encontrar novas moléculas geradas pelo metabolismo secundário das plantas e importantes para a química medicinal seriam inesgotáveis (HARTMANN, 2007). O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, e muito pouco foi avaliado quanto às características biológicas

e menos ainda foram objetos de estudos fitoquímicos (LUNA et al., 2005).

O ambiente marinho é uma fonte importante e pouco explorada de produtos naturais. A exposição constante a ambientes hostis e complexos estimulou a evolução metabólica e fisiológica de espécies marinhas e resultou na produção de metabólitos secundários com potencial promissor devido a estruturas químicas únicas (BHAKUNI; RAWAT, 2005; MASCHKEK; BAKER, 2008). Em relação às algas marinhas, sabe-se que elas são ricas em substâncias biologicamente ativas, como polissacarídeos, proteínas, antioxidantes e ácidos graxos, e sua composição pode sofrer influência da localização geográfica, das condições ambientais, das estações do ano, entre outros (MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012). No contexto da hemostasia, trabalhos já demonstraram que um grande número de polissacarídeos isolados a partir de algas marinhas possui atividade antitrombótica (CUMASHI et al., 2007; MOURA et al., 2011).

As algas podem ser classificadas em função do tipo e material de reserva, e dos pigmentos celulares como: verdes (Chlorophyta), pardas (Ochromphyta) e vermelhas (Rhodophyta), sendo as duas últimas de grande interesse químico (BLUNT et al., 2015).

A costa brasileira possui uma grande variedade de algas marinhas. Entretanto, poucos estudos farmacológicos são realizados para identificar novas substâncias ou encontrar novas estruturas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. O grupo das algas pardas constitui o mais importante em termos de biomassa (OLIVEIRA-FILHO 1977 apud FLEURY et al., 1994), sendo representado pelas ordens Dictyotales e Fucales (TEIXEIRA, 2013).

A ordem Dictyotales consiste na família Dictyotaceae, em que cerca de 20 gêneros são conhecidos, incluindo os gêneros *Dictyota*, *Dictyopteris* e *Canistrocarpus* (CLERCK et al., 2006; SILBERFELD; ROUSSEAU; REVIERS, 2014). O grupo Dictyopteris é produtor de sesquiterpenos unidos ou não a fluoroglucinol, esteroides e substâncias com enxofre (VALLIM et al., 2005; TEIXEIRA, 2013). Estudos apontam que os metabólitos secundários produzidos por essa família possuem atividade citotóxica, antibacteriana, antimalárica, entre outras (SIAMOPOULOU et al., 2004; JONGARAMRUONG, KONGKAM, 2007; ZATELLI, PHILIPPUS, FALKENBERG, 2018). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os extratos brutos de *Canistrocarpus cervicornis* possuem um importante potencial antiagregante (HINKE, 2016), o que sugere que outras algas pertencentes

à mesma ordem, como o gênero *Dictyopteris*, possam apresentar atividade semelhante.

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE 32934714.0.0000.0121 – Anexo A).

4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DAS AMOSTRAS

No presente estudo, foram utilizadas amostras de sangue de doadores de sangue voluntários atendidos no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Aos participantes, foram explicados os princípios, os riscos, e os benefícios inclusos na participação da pesquisa, e, após a concordância com o desenvolvimento do estudo, solicitou-se a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em seguida, foram coletados os tubos de sangue conforme protocolo experimental. Para cada experimento de coagulação sanguínea, de agregação plaquetária ou de citometria de fluxo foram utilizadas amostras de pelo menos quatro doadores saudáveis, sendo que foram coletados dois tubos de sangue contendo citrato de sódio 0,38 % como anticoagulante de cada voluntário. Para os testes de hemólise e os experimentos de citotoxicidade em células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis, foi coletado um tubo de sangue venoso anticoagulado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de pelo menos três doadores para cada experimento.

4.3 EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS

O extrato bruto, frações e compostos isolados naturais foram obtidos e cedidos pela doutoranda Gabriele Andressa Zatelli sob orientação da Professora Doutora Miriam de Barcellos Falkenberg do Laboratório de Investigação de Produtos Naturais Marinhos-UFSC.

4.3.1 Extrato bruto de *Dictyoteris jolyana*

Em novembro de 2014, colaboradores realizaram a coleta de 29,7 gramas de algas *D. jolyana*, com equipamentos de mergulho autônomo, em profundidade de até 30 metros no arquipélago de Fernando de Noronha. As amostras frescas foram congeladas e, previamente à

extração, o material foi descongelado e submetido à triagem para remoção de epífitas e outros organismos. Após, o material foi seco sob ar frio.

A identificação botânica do material coletado foi realizada pelo Prof. Dr. Paulo Horta (Departamento de Botânica, CCB, UFSC) e as exsiccatas depositadas no Herbário FLOR (UFSC). A licença para acesso à biodiversidade foi devidamente obtida pela coordenação do projeto ProspecMar-Ilhas.

O extrato bruto de *Dictyopteris jolyana* (EDJ) foi obtido por sucessivas macerações de todas as partes da alga secas e rasuradas com mistura de diclorometano e metanol na proporção 2:1, em temperatura ambiente, por um período de sete dias, repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. A concentração do extrato foi realizada em rotaevaporador, sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 40 °C.

O EDJ foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) na concentração estoque de 125 mg/mL e armazenado a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas soluções preparadas a partir da solução estoque e diluídas em tampão fosfato-salino (PBS), no mesmo dia do experimento, de forma que a concentração final do extrato brutos fosse de 600 µg/mL.

4.3.2 Frações isoladas do extrato bruto de *Dictyopteris jolyana*

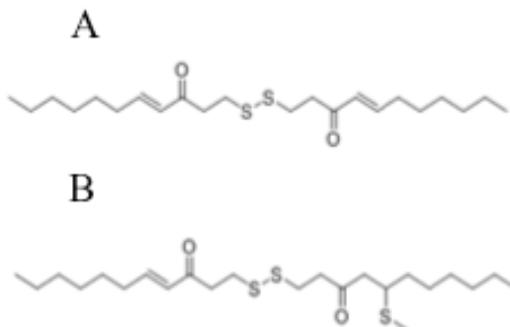
Duas alíquotas do extrato bruto EDJ (10,4611 g e 11,0458 g) foram submetidas à cromatografia líquida a vácuo separadamente com gel de sílica 60. Utilizou-se como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com hexano 100 % e finalizou com metanol 100 %. Cada fração foi coletada em frasco separado, foram analisadas por cromatografia em camada delgada e por ressonância magnética nuclear, reunindo-se aquelas com perfis semelhantes. No presente estudo, foi avaliada a atividade sobre a hemostasia de cinco frações do extrato bruto de *D. jolyana* (FDJ1, FDJ2, FDJ3, FDJ4 e FDJ5). As frações foram dissolvidas em DMSO e estocadas da mesma forma que EDJ. Para a realização dos experimentos, as frações foram diluídas no dia em PBS de forma que as concentrações finais fossem de 600 µg/mL.

4.3.3 Compostos isolados de *Dictyopteris jolyana*

Nessa etapa, foram estudados dois compostos inéditos isolados de *D. jolyana*. Para dar continuidade aos procedimentos de purificação e isolamento de compostos, a fração mais promissora foi selecionada em função do rendimento, do perfil cromatográfico e da atividade sobre a

agregação plaquetária. Dessa forma, dois compostos foram isolados da fração FDJ1, 21,5 mg do composto bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto (IDJ1; Figura 8, Painel A) e 12,2 mg do composto (E)-1-(5-metiltio-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona (IDJ2; Figura 8, Painel B).

Figura 8 - Estruturas propostas para os compostos isolados de *Dictyopterus jolyana*.



Painel A: bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto (IDJ1); Painel B: (E)-1-(5-metiltio-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona (IDJ2).

Fonte: Própria

Os compostos isolados foram dissolvidos em DMSO na concentração estoque de 100 mM e armazenados a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas soluções preparadas a partir da solução estoque e diluídas em PBS no mesmo dia do experimento. A concentração final dos compostos isolados variou de 1000 a 62,5 µM, conforme protocolo experimental.

4.4 ESTUDOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Os ensaios de coagulação sanguínea foram realizados de acordo com Triplett, Harms e Koepke (1978) utilizando-se coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer). Para os ensaios de coagulação, foi utilizado um *pool* de plasma pobre em plaquetas (PPP). Para a obtenção do *pool* de PPP, as amostras de sangue anticoagulado com citrato de sódio 0,38 % foram centrifugadas 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante (PPP) de todos os tubos foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Para a realização dos ensaios, 100 µL do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C

por 5 minutos com 10 μL de extrato bruto de alga ou de veículo de dissolução (DMSO 0,7 % concentração final) e, em seguida, foram realizados os testes de tempo de protrombina (TP) ou de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) conforme a bula do *kit* HemosIL® (Instrumentation Laboratory, Massachusetts, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 ESTUDOS DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação plaquetária foi avaliada de acordo com Born e Cross (1963), utilizando-se um agregômetro semi-automatizado (AgreGO, Qualitem). Depois de coletadas as amostras de sangue total, as plaquetas foram isoladas através de centrifugação do sangue citratado a 123 g por 10 minutos à temperatura ambiente para a obtenção do *pool* de plasma rico em plaquetas (PRP). As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e reajustadas com PBS para 250.000 plaquetas/ mm^3 antes da realização dos experimentos. Para avaliar os efeitos do extrato bruto, frações e compostos isolados sobre a agregação plaquetária, 400 μL do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 μL de extrato bruto, de frações de extrato bruto, de composto isolado ou de veículo de dissolução (DMSO 0,6 % concentração final). A seguir, as amostras foram estimuladas individualmente com ADP (6 μM ; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e epinefrina (6 μM ; Hipolabor, Minas Gerais, BR) e a agregação foi acompanhada por 5 minutos. Além do ADP e da epinefrina, os compostos isolados também foram estimulados com AA (500 μM ; Chrono-Log Corp., Havertown, PA, EUA), colágeno (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chrono-Log Corp., Havertown, PA, EUA) ou PAF (0,1 μM ; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, utilizou-se o PPP obtido pela centrifugação das amostras de sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.5.1 Determinação de CI_{50} de compostos isolados

A concentração inibitória de 50 % (CI_{50}) foi calculada apenas para os compostos isolados. Para a determinação da CI_{50} , os compostos isolados foram utilizados nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 μM . Após realizar a diluição, o PRP foi tratado com os compostos isolados nas várias diluições ou com o veículo de diluição (DMSO 0,6 % concentração final) e a porcentagem de agregação foi determinada conforme já descrito

no item 4.5. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A CI_{50} foi obtida a partir da curva concentração-resposta, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.

4.6 EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GPIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA

A inibição da ativação plaquetária após a adição dos compostos isolados foi avaliada pela metodologia de citometria de fluxo através da determinação da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado e de P-selectina, utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC (clone PAC-1; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e anti-CD62P-PE (clone AK-4; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), respectivamente. Como já mencionado, nas plaquetas não ativadas, a P-selectina está localizada na membrana dos grânulos- α e, após a ativação, passa a ser expressa na membrana plaquetária. Já os anticorpos do tipo PAC1 reconhecem especificamente a conformação ativada da GpIIb/IIIa (LANDI; MARQUES JÚNIOR, 2003). Para auxiliar na identificação das plaquetas, elas também foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD61-PerCP (clone PN IM 1758U; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), que se liga à forma inativa e ativa da GpIIIa das plaquetas. Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) utilizando os *lasers* azul (488 nm, *air-cooled*, 20 mW *solid state*) e vermelho (633 nm, 17 mW HeNe), e o *software* FACSDiva versão 6.1.2 (Becton Dickinson, EUA).

Para a marcação com os anticorpos, 400 μ L do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 μ L de composto em sua CI_{50} ou de veículo de dissolução (DMSO 0,6 % concentração final). A seguir, as amostras foram estimuladas com ADP (6 μ M) ou epinefrina (6 μ M) sem homogeneização. Em seguida, o PRP foi incubado com os anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC (20 μ L), anti-CD62P-PE (5 μ L) e anti-CD61-PerCP (2 μ L) durante 15 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 277 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento suspenso em 500 μ L de PBS e analisado imediatamente por citometria de fluxo. Paralelo ao processo de marcação das plaquetas estimuladas, foi realizada a marcação de tubo controle de autoativação, em que plaquetas não estimuladas com os agonistas foram marcadas com todos os anticorpos monoclonais.

Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados no *software* Infinicyt (Cytognos®) versão 1.7. A população de plaquetas foi identificada por meio das propriedades de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente), bem como pelas suas características de expressão de CD61, conforme ilustrado na Figura 9. Em cada tubo foram analisados 10.000 eventos positivos para CD61 na forma de histogramas e intensidade de fluorescência média (IFM). A IFM dos marcadores foi analisada pela ferramenta de fusão de arquivos (do inglês, *file merge*) do *software* de análise Infinicyt. De forma sucinta, em um primeiro momento, foi realizada a fusão dos arquivos de cada experimento, para em seguida realizar a fusão dos arquivos de cada dia de experimento em um único arquivo. O produto final consiste em um arquivo contendo as informações de um grupo de experimentos que permite a visualização simultânea das plaquetas em relação a todos os marcadores fenotípicos presentes no painel de anticorpos. Os resultados dos ensaios de citometria de fluxo foram representados como porcentagem de inibição segundo a Equação 1 (BIRIS et al., 2003). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

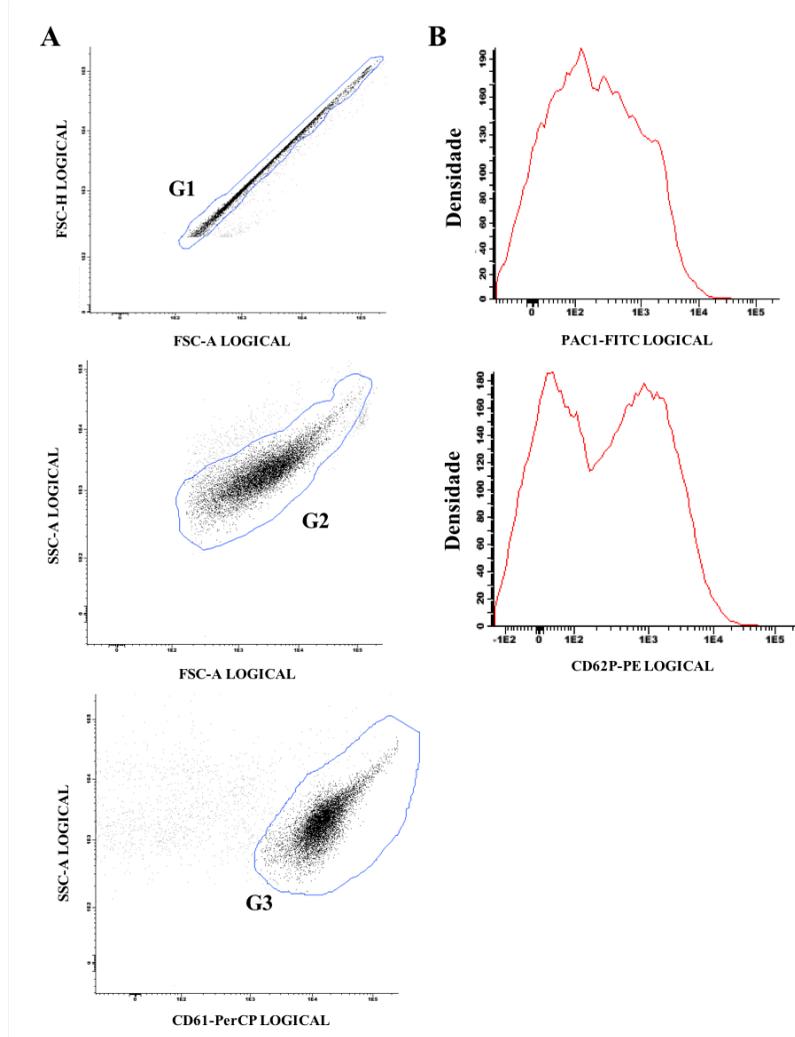
Equação 1 - Cálculo da porcentagem de inibição a partir da Intensidade de Fluorescência Média (IFM).

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \left[\frac{(\text{IFM te} - \text{IFM cse}) \times 100}{(\text{IFM ce} - \text{IFM cse})} \right]$$

IFM - intensidade de fluorescência média; te – teste com estímulo de agonista; ce – controle com estímulo de agonista; cse – controle sem estímulo de agonista.

Fonte: Própria

Figura 9 - Dot-plots e histogramas representativos da análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo



Painel A – Estratégia de reconhecimento de plaquetas por meio da propriedade de *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC) e a expressão de CD61. Painel B – Histograma demonstrando a intensidade de expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e da P-selectina (CD62P) após estimulação das plaquetas com difosfato de adenosina (ADP). G1 – Gate 1; G2 – Gate 2; G3 – Gate 3.

Fonte: Elaboração Própria

4.7 TESTE DE HEMÓLISE

Neste ensaio, os compostos foram avaliados quanto a sua capacidade de induzir a ruptura da membrana de eritrócitos de indivíduos saudáveis e conseqüente hemólise. Para esse ensaio, as amostras de sangue de voluntários foram centrifugadas por 10 minutos a 264 g, e o sedimento foi sucessivamente lavado com solução salina (NaCl 0,9 %) para que os eritrócitos fossem isolados do restante do plasma. Após as lavagens, foi preparada uma suspensão estoque de eritrócitos com solução salina, de forma a obterem-se valores de absorbância entre 1,8 e 2,2 quando realizada leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Para a realização dos testes, misturou-se em tubos tipo eppendorf 50 µL de suspensão estoque de eritrócitos e 950 µL de solução salina, e essas suspensões foram tratadas com os compostos isolados (IDJ1 e IDJ2) nas concentrações finais no tubo de 500 µM e 1000 µM. Como controle positivo (100 % de hemólise), utilizou-se 50 µL de suspensão estoque de eritrócitos com adição de 950 µL de água destilada, como controle negativo (0 % de hemólise) misturou-se 50 µL de suspensão estoque de eritrócitos com 950 µL de solução salina, e amostras testes (50 µL de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µL de solução salina contendo diferentes concentrações dos compostos analisados).

Cada tubo teste foi incubado a 37 °C por uma hora sobre agitação de 100 g (WANG et al., 2009). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos, e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro Microwell Systems a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A taxa de hemólise foi calculada de acordo com a densidade óptica de cada amostra e controles, relacionada à quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante devido a ruptura dos eritrócitos (Equação 2).

Equação 2 - Cálculo da taxa de hemólise

$$\text{Taxa de Hemólise (\%)} = \frac{DO_t - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 100$$

DO_t: densidade óptica da amostra teste; DO_{cn}: densidade óptica do controle negativo; DO_{cp}: densidade óptica do controle positivo.

Fonte: Própria

4.8 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *D. jolyana* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS

Para avaliar o efeito dos compostos isolados (IDJ1 e IDJ2) sobre a viabilidade celular, foi utilizado o método do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio; Amresco[®]). O método do MTT é um ensaio colorimétrico sensível e quantitativo, que consiste em medir a atividade das desidrogenases mitocondriais que reduzem o MTT, um composto hidrossolúvel de cor amarelo-pálido, ao seu derivado formazan, um composto de cor roxa e não solúvel em água, indicando o funcionamento mitocondrial e, por conseguinte, a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Para obter as células mononucleares, as amostras de sangue periférico foram diluídas em PBS em uma proporção de dois volumes de amostra para um volume de PBS. A diluição foi colocada sobre 4 mL de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m³, Sigma-Aldrich[®], EUA) e centrifugada a 300 g por 30 minutos. A interfase com as células mononucleadas foi transferida para um tubo tipo Falcon, suspendida em 10 mL de tampão PBS e centrifugada a 200 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com PBS. Ao fim das lavagens, as células foram suspensas em meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco[®]) 1640 para a contagem do número de células viáveis. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5 %) em meio RPMI 1640, na proporção 1:1. Apenas as amostras com viabilidade celular superior a 95 % foram utilizadas nos experimentos.

Após a contagem, foram adicionadas $5,0 \times 10^5$ células/200 µL de meio a cada poço da placa de cultura celular de 96 poços. Em seguida, as células mononucleares foram incubadas com os compostos isolados (500 µM), ou com o veículo de dissolução (DMSO 0,6 % concentração final). Após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Sucintamente, após o tempo de incubação, as placas de 96 poços foram centrifugadas, o sobrenadante removido, e adicionado novo meio de cultura contendo 10 % (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Depois de três horas de incubação a 37 °C, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em solução ácida de isopropanol (isopropanol/HCl 0,04 N) e em seguida foi realizada a

leitura das absorvâncias no espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika®) no comprimento de onda 540 nm.

Os valores de absorvância medidos para cada concentração de composto foram transformados em porcentagens de viabilidade, em relação aos controles celulares (DMSO 0,6 %), considerados 100 % viáveis. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *D. jolyana*

A estipulação teórica de solubilidade e permeabilidade dos compostos isolados (IDJ1 e IDJ2) foi realizada utilizando-se modelos computacionais para verificar os parâmetros físicoquímicos propostos por Lipinski e cols. (2001). Os valores de massa molecular (MM), milog P, número de grupamentos aceptores de ligação hidrogênio (N + O), número de grupamentos doadores de ligação hidrogênio (NH + OH), número de ligações rotáveis, área de superfície polar e o número de violações das regras foram obtidos a partir do programa *freeware Free molinspiration* disponibilizado *online*, através do JME Editor, cortesia de Peter Ertl da Novartis, disponível no *site*: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software* SPSS versão 17.0® e para a construção dos gráficos utilizou-se o *software* GraphPad Prism 5.0®. As variáveis numéricas foram expressas como média e desvio-padrão. Conforme a necessidade, as médias das variáveis foram comparadas utilizando-se o teste t de Student para amostras pareadas, o teste t de Student para amostras independentes, ou a análise de variância de uma via (ANOVA de uma via) com pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Foi adotado um nível de significância de 5 % ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO DE *D. jolyana* (EDJ) SOBRE A HEMOSTASIA

Neste trabalho, foi avaliado o efeito do extrato bruto da alga marinha *D. jolyana* (EDJ) sobre a coagulação sanguínea (Tabela 1). O TP na presença do extrato EDJ (600 µg/mL) foi de $13,9 \pm 0,9$ s, e o TTPa foi de $34,3 \pm 0,4$ s.

Tabela 1 - Efeito do extrato bruto de *D. jolyana* (EDJ) sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

Tratamento	TP (s)	TTPa (s)
	Média ± DP	Média ± DP
Controle (DMSO 0,6 %)	12,6 ± 1,0	31,1 ± 1,1
EDJ (600 µg/mL)	13,9 ± 0,9	34,3 ± 0,4

DP - desvio padrão; DMSO - dimetilsulfóxido. N = 3. Teste t de Student pareado. Fonte: Elaboração Própria

Pode-se observar que, em relação ao controle contendo apenas DMSO (TP = $12,6 \pm 1,0$ s e TTPa = $31,1 \pm 1,1$ s), EDJ não prolongou significativamente os tempos de TP e TTPa, o que indica que esse extrato não atua sobre as vias extrínseca, intrínseca ou comum da coagulação sanguínea.

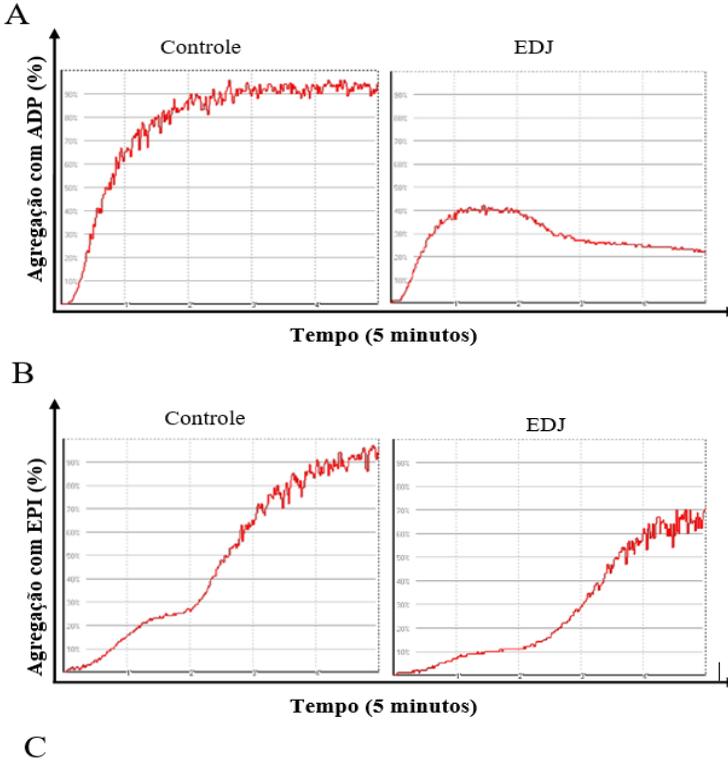
Além da atividade anticoagulante, também foi avaliado o efeito do extrato bruto EDJ sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina (Figura 10). Quando o ADP foi utilizado como agonista, a agregação na presença de EDJ (600 µg/mL) foi de $19,5 \pm 3,5$ %. Nos ensaios de agregação estimulada por epinefrina, a agregação na presença de EDJ foi de $67,0 \pm 2,8$ %.

Ao observar os Painéis A e B na Figura 10, pode-se perceber que o tratamento com EDJ inibiu a segunda onda de agregação e foi capaz de reverter parcialmente a primeira onda de agregação induzida por ADP. Contudo, o EDJ foi capaz de apenas diminuir a amplitude da segunda onda de agregação da epinefrina.

Como também pode ser observado na Figura 10, Painel C, o EDJ promoveu inibição significativa da agregação plaquetária induzida pelo

ADP e pela epinefrina quando comparado com o controle contendo apenas o veículo de dissolução.

Figura 10 - Efeito do extrato bruto de *D. jolyana* sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina



Tratamento	ADP	Epinefrina
	Média ± DP %	Média ± DP %
Controle (DMSO 0,6 %)	87,3 ± 7,9	90,3 ± 6,8
EDJ (600 µg/mL)	19,5 ± 3,5*	67,0 ± 2,8*

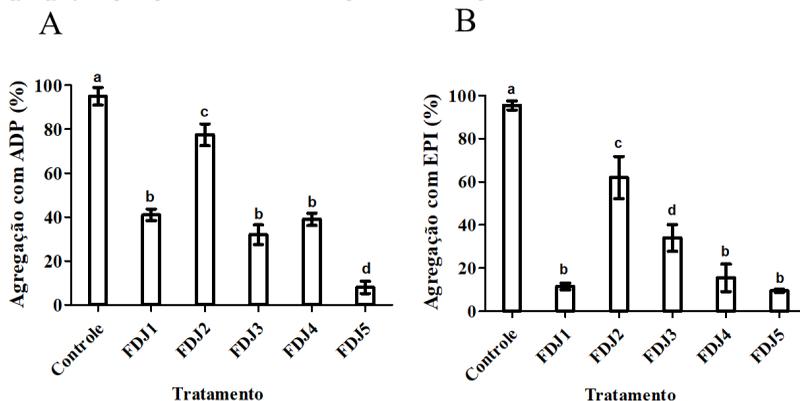
Painel A: Agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 6 µM). Painel B: Agregação plaquetária induzida por epinefrina (EPI - 6 µM). Imagens ilustrativas de um experimento de três. Painel C: Agregação plaquetária média frente aos agonistas ADP e epinefrina (N = 3). EDJ - extrato bruto de *D. jolyana* 600 µg/mL; DP – desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao controle (P ≤ 0,05). ANOVA de uma via, pós-teste Tukey.

Fonte: Elaboração Própria

5.2 ATIVIDADE DAS FRAÇÕES FDJ1, FDJ2, FDJ3, FDJ4 e FDJ5 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Tendo em vista o potencial antiagregante do EDJ, foi avaliado o efeito sobre a agregação plaquetária de cinco frações obtidas a partir desse extrato bruto. A agregação plaquetária média induzida por ADP na presença da fração FDJ1 foi de $41,0 \pm 2,6$ %, da FDJ2 foi de $77,5 \pm 4,9$ %, da FDJ3 foi de $32,0 \pm 4,2$ %, da FDJ4 foi de $39,0 \pm 2,8$ %, e da FDJ5 foi de $8,0 \pm 2,8$ %, sendo que a agregação média do controle com DMSO foi de $95,0 \pm 4,0$ % (Figura 11, Painei A).

Figura 11 - Efeito das frações FDJ1, FDJ2, FDJ3, FDJ4 e FDJ5 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina



Painel A: Agregação induzida por difosfato de adenosina (ADP - 6 μ M). Painel B: Agregação induzida por epinefrina (EPI - 6 μ M). Controle - DMSO 0,6 %; FDJ - Fração de *D. jolyana*. As frações foram testadas em uma concentração final de 600 μ g/mL. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). *Letras “a”, “b” e “c” - As frações identificadas com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre si, frações identificadas com letras iguais não tiveram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). ANOVA de uma via, pós-teste Bonferroni.

Fonte: Elaboração Própria

5.3 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS ISOLADOS IDJ1 E IDJ2

Devido ao potencial antiagregante da fração FDJ1, bem como do seu rendimento e perfil cromatográfico, foram selecionados dois compostos isolados dessa fração, o IDJ1 e o IDJ2, para avaliar a sua atividade sobre a agregação e ativação plaquetária. Adicionalmente, para

verificar o seu potencial de uso em testes *in vivo*, também foi avaliada a hemocompatibilidade (teste de hemólise), a citotoxicidade contra células mononucleadas de indivíduos clinicamente saudáveis e a biodisponibilidade oral desses compostos.

5.3.1 Efeito de IDJ1 e IDJ2 sobre a agregação plaquetária

Como pode ser observado na Tabela 2, a agregação plaquetária estimulada por ADP na presença de IDJ1 foi de $43,5 \pm 4,9$ % e de IDJ2 foi de $49,5 \pm 3,5$ %. Quando utilizada a epinefrina como agonista, a agregação na presença de IDJ1 foi de $45,6 \pm 8,1$ % e de IDJ2 foi de $57,5 \pm 3,5$ %. A agregação plaquetária estimulada com AA na presença de IDJ1 foi de $53,5 \pm 4,9$ % e de IDJ2 foi de $51,5 \pm 0,7$ %. Quando utilizado o colágeno como agonista, a agregação na presença de IDJ1 foi de $49,5 \pm 4,9$ % e de IDJ2 foi de $77,5 \pm 4,9$ %. Já o estímulo com PAF como agonista na presença de IDJ1 e de IDJ2 foi de $43,0 \pm 2,8$ % e de $79,5 \pm 4,9$ %, respectivamente.

Tabela 2 - Efeito de IDJ1 e IDJ2 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF

	ADP (%)	EPI (%)	AA (%)	COL (%)	PAF (%)
Controle	$96,5 \pm 0,7$	$95,5 \pm 2,1$	$85,3 \pm 3,8$	$92,3 \pm 3,7$	$94,0 \pm 5,9$
IDJ1	$43,5 \pm 4,9^*$	$45,6 \pm 8,1^*$	$53,5 \pm 4,9^*$	$49,5 \pm 4,9^*$	$43,0 \pm 2,8^*$
IDJ2	$49,5 \pm 3,5^*$	$57,5 \pm 3,5^*$	$51,5 \pm 0,7^*$	$77,5 \pm 4,9$	$79,5 \pm 4,9$

Controle - DMSO 0,6 %; IDJ1 - bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metil-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona; ADP - difosfato de adenosina (6 μ M); EPI - epinefrina (6 μ M); AA - ácido araquidônico (500 μ M); COL - colágeno (2 μ g/mL); PAF - fator de ativação plaquetária (0,1 μ M). Os compostos foram testados em uma concentração final de 500 μ M. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). *Diferença significativa em relação ao controle (P \leq 0,05). Teste t de Student pareado.

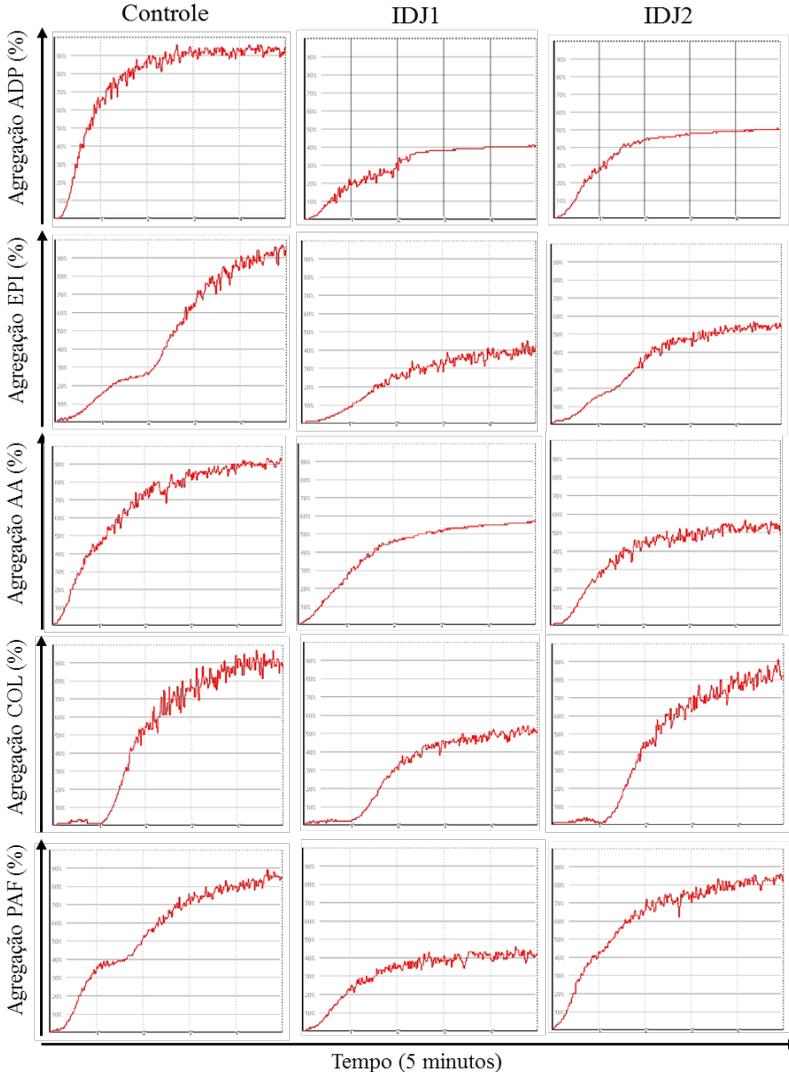
Fonte: Elaboração Própria

Ao comparar com o controle, pode-se observar que o IDJ1 inibiu de forma significativa a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados. Já o IDJ2 não foi capaz de inibir significativamente a agregação induzida por colágeno e PAF. Portanto, IDJ1 apresentou

melhor atividade antiagregante, uma vez que foi capaz de inibir de 46,5 % a 57,0 % a agregação induzida pelos agonistas.

Assim como o percentual de agregação, também foi avaliada a dissociação da primeira e segunda onda de agregação induzida pelos agonistas em presença de IDJ1 e IDJ2 (Figura 12). Quando comparadas com as curvas de controle e os perfis característicos de cada agonista, pode-se afirmar que o efeito inibitório de IDJ1 e IDJ2 parece estar essencialmente associado à inibição da segunda onda de agregação, uma vez que esta foi inibida eficazmente por IDJ1 frente a todos os agonistas testados. O composto IDJ2 também apresentou o mesmo perfil, porém isso não foi observado quando o colágeno e o PAF foram utilizados como agonistas.

Figura 12 - Efeito de IDJ1 e IDJ2 no perfil de agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF



Controle - DMSO 0,6 %; IDJ1 - bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metil-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona; ADP - difosfato de adenosina (6 μ M); EPI - epinefrina (6 μ M); AA - ácido araquidônico (500 μ M); COL - colágeno (2 μ g/mL); PAF - fator de ativação plaquetária (0,1 μ M). Imagens ilustrativas de um experimento de três.

Fonte: Elaboração Própria

5.3.2 Determinação de CI_{50} de IDJ1 e IDJ2

Uma vez que IDJ1 e IDJ2 foram capazes de inibir significativamente a agregação plaquetária, foram realizadas diluições seriadas de razão dois dos compostos para verificar se a atividade antiagregante deles era concentração dependente (Figura 13). Ressalta-se que foram determinadas as curvas de concentração resposta utilizando-se apenas os agonistas cuja ação foi significativamente inibida pelo composto.

A partir das curvas de dose resposta, também foram calculadas as respectivas CI_{50} (Tabela 3). Por ultrapassar a linearidade da curva e ter valores maiores que 500 μM , não foi possível determinar a CI_{50} do IDJ1 para o AA, e do IDJ2 para o ADP e o AA. Dentre as duas substâncias isoladas, o IDJ1 apresentou as melhores CI_{50} , que foram de $441,5 \pm 4,8$ μM frente ao ADP; de $407,3 \pm 7,0$ μM frente à epinefrina; de $319,2 \pm 7,5$ μM frente ao colágeno e de $410,4 \pm 6,7$ μM frente ao PAF.

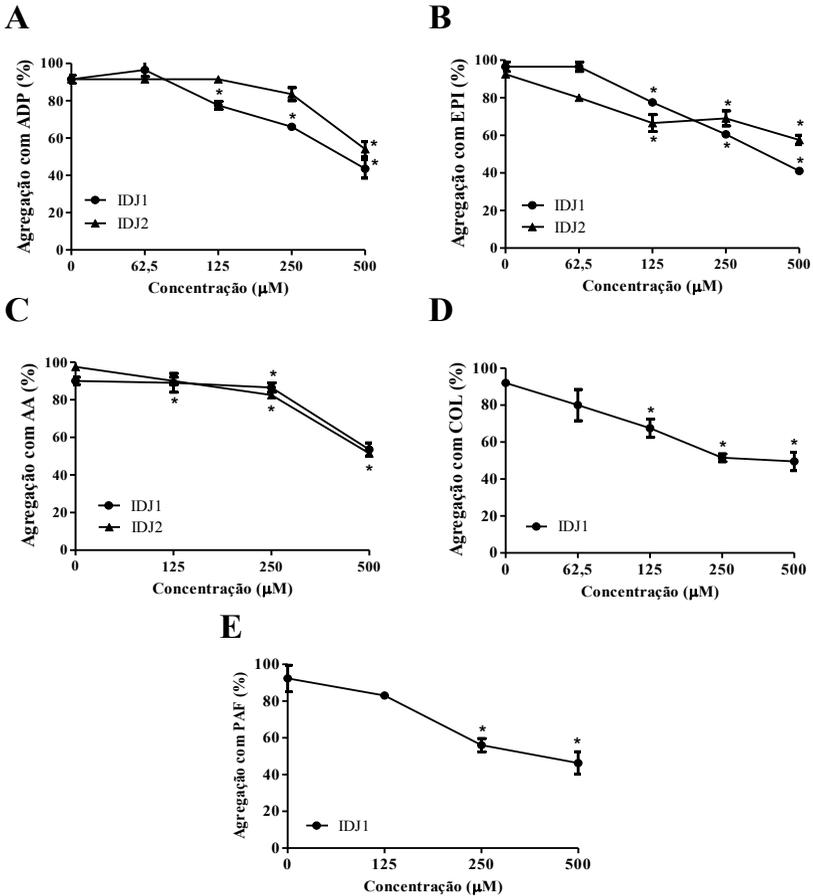
Tabela 3 - Efeito de IDJ1 e IDJ2 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF

Tratamento	CI_{50} (μM)				
	ADP	EPI	AA	COL	PAF
IDJ1	$441,5 \pm 4,8$	$407,3 \pm 7,0$	> 500	$319,2 \pm 7,5$	$410,4 \pm 6,7$
IDJ2	> 500	$476,1 \pm 13,8$	> 500	NR	NR

IDJ1- bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metiltio-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona.; ADP - difosfato de adenosina (6 μM); EPI - epinefrina (6 μM); AA - ácido araquidônico (500 μM); COL - colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$); PAF - fator de ativação plaquetária (0,1 μM); NR - não realizado. Os dados foram expressos como valores de CI_{50} (μM) \pm erro padrão (N = 3).

Fonte: Elaboração Própria

Figura 13 - Curvas de agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, AA, colágeno e PAF em função da concentração de IDJ1 e IDJ2



Painel A: Curva de agregação concentração-dependente induzida por difosfato de adenosina (ADP - 6 μM). Painel B: Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina (EPI - 6 μM). Painel C: Curva de agregação concentração-dependente induzida por ácido araquidônico (AA - 500 μM). Painel D: Curva de agregação concentração-dependente induzida por colágeno (COL - 2 μg/mL). Painel E: Curva de agregação concentração-dependente induzida por fator de ativação plaquetária (PAF - 0,1 μM). IDJ1- bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metil-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (N = 3). *Diferença significativa em relação ao controle negativo contendo apenas DMSO 0,6% (P ≤ 0,05). ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaboração Própria

5.3.3 Ação de IDJ1 e IDJ2 sobre a expressão membranar da GpIIb/IIIa ativada e de P-selectina

Com o intuito de investigar como os compostos isolados afetam a agregação, foi avaliado se o tratamento com IDJ1 e IDJ2 afetava a ativação plaquetária. Para tanto, verificou-se se os compostos alteravam a expressão membranar de P-selectina e a ativação da GpIIb/IIIa, através da marcação de plaquetas estimuladas com anti-CD62P e anti-PAC1, respectivamente.

Como se pode observar na Tabela 4 e na Figura 14, os compostos IDJ1 e IDJ2 afetaram de maneira diferente a expressão desses marcadores. O IDJ1 inibiu de maneira mais efetiva a expressão de PAC1 (79,4 %) e de P-selectina (69,2 %) quando a epinefrina foi utilizada como agonista. Por outro lado, o tratamento com IDJ2 diminuiu de forma mais efetiva a expressão de PAC1 (87,5 %) e de P-selectina (75,0 %) quando o ADP foi utilizado como agonista (Tabela 4).

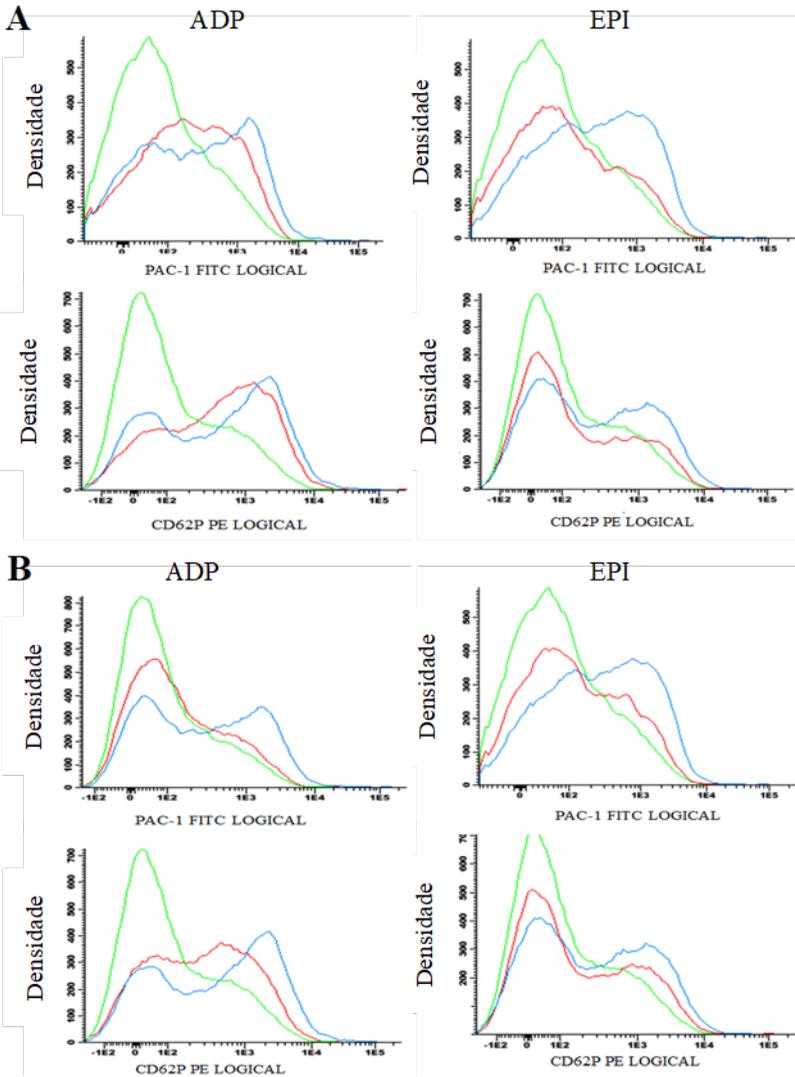
Tabela 4 - Porcentagem de inibição calculada da expressão de PAC1 e de CD62P

	Inibição (%)			
	Ligação com PAC-1		Expressão de P-selectina	
	ADP	EPI	ADP	EPI
IDJ1	67,4	79,4	51,4	69,2
IDJ2	87,5	72,7	75,0	52,1

A porcentagem de inibição da expressão de PAC1 e CD62P foi calculada a partir das intensidades de fluorescência médias obtidas após a fusão dos arquivos das duplicatas com a ferramenta *File Merge*, disponível no *software* Infinicyt. ADP - difosfato de adenosina (6 μ M); EPI - epinefrina (6 μ M).

Fonte: Elaboração Própria

Figura 14- Efeito de IDJ1 e IDJ2 na expressão membranar da GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e de P-selectina (CD62P) em plaquetas estimulados por ADP e epinefrina



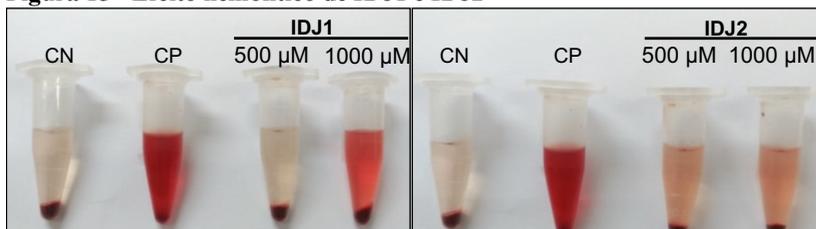
Painel A: Histogramas do efeito de IDJ1 na expressão de PAC1 e de CD62P.
 Painel B: Histogramas do efeito de IDJ2 na expressão de PAC1 e de CD62P.
 Verde - controle (DMSO 0,6 %); Vermelho – Replicata 1; Azul – Replicata 2;
 ADP - difosfato de adenosina (6 μ M); EPI - epinefrina (6 μ M).

Fonte: Elaboração Própria

5.3.4 Avaliação de hemocompatibilidade de IDJ1 e IDJ2 pelo teste de hemólise

O ensaio de hemólise foi avaliado através da mensuração de hemoglobina liberada devido à ruptura da membrana eritrocitária após um período de incubação de uma hora com cada um dos compostos. Na concentração de 500 μM , os compostos IDJ1 ($1,4 \pm 0,1\%$) e IDJ2 ($2,6 \pm 2,7\%$) causaram pequena hemólise. Contudo, na concentração de 1000 μM , os compostos IDJ1 e IDJ2 causaram hemólise um pouco mais intensa, de $13,5 \pm 4,4\%$ e $7,2 \pm 3,6\%$, respectivamente. Os resultados destes experimentos estão representados de maneira qualitativa na Figura 15.

Figura 15 - Efeito hemolítico de IDJ1 e IDJ2



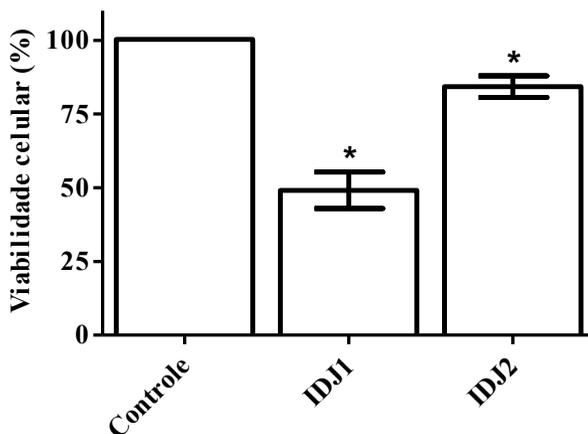
IDJ1 - bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metil-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona; CN - Controle negativo (0 % hemólise); CP - Controle positivo (100 % hemólise). Imagens ilustrativas de um experimento de três.

Fonte: Elaboração Própria

5.3.5 Efeito de IDJ1 e IDJ2 em células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis

Com o intuito de investigar o possível efeito citotóxico de IDJ1 e IDJ2, células mononucleadas de sangue periférico de seis indivíduos saudáveis foram incubadas com 500 μM de cada composto por 24 horas. Conforme pode ser observado na Figura 16, a viabilidade celular após 24 horas do tratamento com IDJ1 ($49,1 \pm 6,2\%$) e IDJ2 ($84,3 \pm 3,7\%$) reduziu significativamente. O solvente DMSO 0,6 % não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle de células sem tratamento (dado não mostrado).

Figura 16 - Efeito citotóxico de IDJ1 (500 μ M) e IDJ2 (500 μ M) sobre células mononucleadas de indivíduos clinicamente saudáveis



Controle - DMSO 0,6 %; IDJ1 - bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metil-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 6) *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($P \leq 0,05$). Teste t de Student.

Fonte: Elaboração Própria

5.3.6 Predição da biodisponibilidade oral de IDJ1 e IDJ2

Os dois compostos isolados foram avaliados em função de parâmetros físico-químicos, a fim de estimar teoricamente suas características de solubilidade e permeabilidade nas membranas biológicas. Dentre os dados obtidos no programa Molinspiration (Tabela 5) estão o coeficiente de partição octanol-água (miLogP), a massa molecular, o número de grupamentos aceptores de ligação de hidrogênio (nON) e o número de grupamentos doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH) que compõem a regra dos cinco de Lipinski, cujos valores são múltiplos do número cinco. Além destas, outras propriedades que não fazem parte da regra dos cinco, mas são informações complementares também são calculadas pelo programa, como o volume, número de ligações rotativas (N rotb) e área de superfície polar topológica (TPSA).

Segundo os parâmetros componentes da regra dos cinco de Lipinski, as moléculas de IDJ1 e IDJ2 possuem potencial biodisponibilidade oral, pois violam apenas uma regra das cinco de Lipinski e cols. (2001), eles possuem miLogP maior do que 4,15.

Diferentemente dos compostos avaliados no presente estudo, o AAS e o clopidogrel, duas moléculas com atividade antiagregante amplamente administrados na clínica por via oral, não violam nenhuma regra.

Tabela 5 - Propriedades estruturais de IDJ1, IDJ2, AAS e clopidogrel calculadas utilizando a plataforma Molinspiration Cheminformatics

	Regra	IDJ1	IDJ2	AAS	Clopidogrel
*miLogP	≤ 4,15	7,64	7,66	1,43	4,13
N átomos	-	26	28	13	22
*MM	< 500	398,68	446,79	180,16	335,86
*nON	≤ 10	2	2	4	3
*nOHNH	≤ 5	0	0	1	0
N rotb	< 10	19	21	3	4
Volume	-	410,04	450,94	155,57	298,64
TPSA	-	34,14	34,14	63,60	29,54
N violações	≤ 1	1	1	0	0

IDJ1 - bis(E)-(3-oxo-undec-4-enil) dissulfeto; IDJ2 - (E)-1-(5-metilto-3-oxo-undecil) dissulfanilundec-4-en-3-ona; AAS - ácido acetilsalicílico; miLog P - predição de LogP desenvolvida por Molinspiration (miLogP2.2 - Novembro, 2005); N átomos - número de átomos; MM - massa molecular; nON - número de N e O aceptores de ligação de H; nOHNH - número de NH e OH doadores de ligação de H; N rotb - número de ligações rotativas; TPSA - área de superfície polar topológica; N violações - número de violações da regra dos cinco de Lipinski. * Parâmetros considerados por Lipinski na regra dos cinco.

Fonte: Elaboração Própria

6 DISCUSSÃO

Processos patológicos que afetem os componentes hemostáticos podem resultar em eventos hemorrágicos ou complicações tromboembólicas. No decorrer dos últimos anos, as doenças cardiovasculares representaram uma das principais causas de óbito e invalidez no mundo. Esses eventos são considerados um problema de saúde pública, principalmente no Brasil, onde a elevada incidência, morbidade e mortalidade de eventos tromboembólicos e de suas complicações estão associados ao seu elevado custo para o SUS (WEITZ; EIKELBOOM, 2016).

Atualmente, os eventos trombóticos podem ser prevenidos e tratados com medicamentos antiagregantes ou anticoagulantes. Dentre eles, destacam-se os antiplaquetários, onde se incluem o AAS e o clopidogrel, e os medicamentos anticoagulantes, como os antagonistas da vitamina K e os inibidores indiretos do fator Xa (KIM et al., 2010; SURIN et al., 2010). No entanto, não existe ainda uma terapia eficiente e segura para o tratamento destes distúrbios (BAGLIN, 2013).

Por essa razão, ainda se faz necessária a busca por novas moléculas que apresentem efeito antitrombótico e anticoagulante, mas que sejam clinicamente seguras, eficazes, com melhor custo-benefício e de simples monitorização laboratorial (KIM et al., 2010; SURIN et al., 2010; BAGLIN, 2013). Nesse contexto, os produtos naturais são uma área de grande interesse hoje e o ambiente marinho, por ser uma importante fonte de moléculas bioativas, vem sendo explorado (MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012; KU et al., 2013).

O ambiente marinho abrange uma série de macro e microrganismos que desenvolveram habilidades metabólicas para garantir sua sobrevivência em habitats diversos e hostis, resultando na biossíntese de uma série de metabólitos com estruturas químicas únicas, que desempenham atividades específicas e que, por vezes, são sem precedentes no ambiente terrestre (MARTINS et al., 2014).

Alguns destes produtos marinhos também apresentam atividades farmacológicas, como antiviral (CIRNE-SANTOS et al., 2006), antifúngica (DOMINGOS et al., 2011) citotóxica, (AZEVEDO et al., 2008), anti-inflamatória, antiangiogênica, (CUMASHI et al., 2007), anticoagulante (MOURA et al., 2014) entre outras, o que demonstra seu potencial como fonte de novos compostos com atividades biológicas. Desta forma, moléculas bioativas de origem marinha têm sido amplamente estudadas quanto às suas atividades sobre as plaquetas e

sobre a coagulação, na procura por novos protótipos para o desenvolvimento de terapias antitrombóticas (MARTINS et al., 2014).

A alga *Dictyopteris jolyana* é uma alga marinha parda pertencente à família Dictyotaceae. Este gênero encontra-se amplamente distribuído no Oceano Atlântico, Índico e Pacífico e parece ter maior número de espécies nos oceanos tropicais (GUIRY, 2005; NUNES; PAULA, 2006). O grupo Dictyopteris é produtor de sesquiterpenos, esteroides e substâncias com enxofre (VALLIM et al., 2005; TEIXEIRA, 2013), que possuem atividade citotóxica, antibacteriana, antimalárica, entre outras já relatadas na literatura (SIAMOPOULOU et al., 2004; JONGARAMRUONG; KONGKAM, 2007).

Nesse contexto, o presente trabalho investigou a atividade de extrato bruto, de frações e de compostos isolados de *D. jolyana* sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea humana, pois estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que extratos brutos de *Canistrocarpus cervicornis* possuem um importante potencial antiagregante (HINKE, 2016), o que sugere que outras algas pertencentes à mesma família, como o gênero *Dictyopteris*, possam apresentar atividade semelhante. Com o intuito de verificar a hipótese de que *D. jolyana* possui potencial atividade sobre a hemostasia humana, foi realizada uma triagem inicial com o extrato bruto da alga (EDJ), em que se avaliou se o tratamento da amostra com EDJ era capaz de alterar significativamente a hemostasia secundária (TP e TTPa) ou a hemostasia primária (agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina). Os resultados mostraram que EDJ não prolongou de forma significativa os tempos de TP e TTPa (Tabela 1), o que sugere que esse extrato não tem efeito nas vias da coagulação sanguínea humana.

Com relação à ação sobre a hemostasia primária, EDJ foi capaz de inibir em 80,5 % a agregação plaquetária induzida por ADP. Quando foi utilizada a epinefrina como agonista, EDJ também inibiu significativamente a agregação plaquetária (33,0 %).

As interações que iniciam e envolvem os processos de coagulação sanguínea e de agregação plaquetária são muito diferentes entre si (LESLIE, 2010; VERSTEEG et al., 2013) o que torna admissível que substâncias que atuem sobre uma fase da hemostasia não apresentem efeito semelhante sobre a outra fase. Estudos já mostraram que extratos brutos de plantas que apresentaram atividade antiagregante, não atuavam sobre a coagulação (NEIVA et al., 2008; LEE et al., 2013), e o contrário também ocorreu em outro trabalho (ROBERT et al., 2010). Contudo, considerando-se que os extratos brutos são constituídos por uma mistura

de compostos, alguns estudos encontraram extratos brutos que apresentavam as duas atividades simultaneamente (LAU et al., 2009; MOURA et al., 2011; KIM, 2011). Um desses trabalhos foi o de Moura e cols. (2011), que demonstraram que extratos brutos de algas pardas, incluindo algas do gênero *Dictyota*, tinham atividade anticoagulante e antiagregante. Contudo, nesse mesmo estudo, apenas um dos sete extratos brutos avaliados foi capaz de inibir a agregação plaquetária estimulada por ADP, sendo que a inibição foi de apenas 20 % (MOURA et al., 2011), inferior a encontrada no presente estudo. Essa diferença do potencial antiagregante dos extratos brutos pode estar relacionada a alguns fatores, como a espécie da alga, o sítio de coleta do espécime e o método de obtenção do extrato bruto.

Apesar de EDJ ser capaz de inibir a agregação induzida tanto por ADP quanto por epinefrina, o perfil das suas curvas de agregação difere entre si (Figura 10). De modo geral, para que a agregação plaquetária ocorra, é necessária a ativação das vias mediadas por G_q e G_i (PULCINELLI et al., 1999; WOULFE; YANG; BRASS, 2001). O ADP é capaz de promover a ativação desses dois mediadores através da sua ligação com os receptores $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$, respectivamente. Em circunstâncias normais, o receptor $P2Y_{12}$ é responsável por amplificar e estabilizar a agregação plaquetária passageira que é iniciada por $P2Y_1$ (WOULFE; YANG; BRASS, 2001; BROOS, 2011; CATTANEO, 2015). Dessa forma, plaquetas de indivíduos que apresentam deficiência de $P2Y_1$, quando estimuladas com ADP, são incapazes de mudar de forma ou agregar adequadamente, apresentando percentuais de agregação diminuídos. Por outro lado, pacientes com deficiência de $P2Y_{12}$ apresentam apenas uma agregação fraca e transitória, e ausência de secreção em resposta a uma alta concentração de ADP (HARRISON et al., 2011; DAWOOD et al., 2012). Ao observar o perfil da curva de agregação de ADP (Figura 10), percebe-se que EDJ foi capaz de inibir a segunda onda e reverter parcialmente a primeira onda de agregação, o que sugere que não houve uma adequada ativação de $P2Y_{12}$. Essa hipótese é reforçada pela observação do perfil da curva de agregação estimulada por epinefrina, em que houve apenas a diminuição da amplitude da segunda onda de agregação. A epinefrina ativa plaquetas via receptores α_2 -adrenérgicos, que são acoplados a proteína G_i . Com isso, todas as funções exercidas por $P2Y_{12}$ podem ser mimetizadas pelos receptores de epinefrina (DORSAM; KUNAPULI, 2004; BROOS, 2011), o que possibilita que ocorra agregação plaquetária mesmo na deficiência de $P2Y_{12}$. Contudo, uma vez que $P2Y_{12}$ está envolvido nos processos de

amplificação de sinal de agregação iniciada por outros agonistas, como a epinefrina, a deficiência desse receptor gera perfis hipoagregantes quando outros agonistas que não o ADP são utilizados (HARRISON et al., 2011; DAWOOD et al., 2012; CIMMINO; GOLINO, 2013; CATTANEO, 2015), o que explicaria porque EDJ foi capaz de inibir significativamente a agregação induzida por epinefrina, mas não inibir a primeira onda de agregação. Entretanto, deve-se ressaltar que os extratos brutos de plantas são uma mistura de compostos que podem atuar de forma sinérgica ou em múltiplas vias bioquímicas, e a análise dos resultados do presente estudo não permite afirmar que EDJ também não interfira em outras vias de sinalização, o que também explicaria a diferença de atividade antiagregante para os dois agonistas.

Tendo em vista seu potencial antitrombótico, foram avaliados os efeitos de cinco frações de EDJ sobre a agregação plaquetária (Figura 11). Todas as frações inibiram significativamente a agregação induzida por ADP e epinefrina, sendo que a fração FDJ2 foi a que apresentou menor atividade antiagregante para os dois estímulos utilizados. A fração FDJ5 foi a que melhor inibiu a agregação induzida por ADP, no entanto, sua capacidade de inibir a agregação estimulada pela epinefrina foi equivalente a apresentada pelas frações FDJ1 e FDJ4. Esses resultados indicam que todas as frações testadas apresentam em sua composição uma ou mais substâncias que são capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina, e, muito provavelmente, os mecanismos de inibição das frações são semelhantes ao de EDJ, ou seja, através da inibição de P2Y₁₂. No entanto, aparentemente, a fração FDJ5 apresenta maior concentração de compostos ativos, ou é constituída de compostos que são mais eficazes em inibir a agregação induzida por ADP. Apesar dos resultados promissores, não foi possível dar continuidade à investigação da atividade antiagregante de FDJ5 devido ao seu baixo rendimento.

Diante disso, a fração FDJ1 foi considerada a mais promissora para dar continuidade às investigações, uma vez que, além de inibir significativamente a agregação plaquetária, também teve um bom rendimento e um perfil cromatográfico interessante, uma vez que parecia ser rico em substâncias sulfatadas (dados não mostrados). A presença de enxofre é promissora, uma vez que ele é essencial para a ação do clopidogrel e da ticlopidina, que são dois fármacos antiagregantes amplamente utilizados na clínica, e com mecanismos de ação semelhantes ao proposto para EDJ e FDJ1. O clopidogrel e a ticlopidina são pró-fármacos que precisam ser metabolizados através de duas etapas pelos

hepatócitos para gerarem metabólitos que possuem um grupamento tiol que irá se ligar e inibir irreversivelmente aos receptores P2Y₁₂ (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; MASENENI et al., 2012). A partir de FDJ1 foram isolados dois compostos, IDJ1 e IDJ2.

Os compostos isolados IDJ1 e IDJ2 foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina (Tabela 2), o que indica que eles podem estar diretamente relacionados a inibição da agregação plaquetária observada quando o PRP foi tratado com EDJ e FDJ1.

Com o intuito de começar a entender o mecanismo de ação dos dois compostos, além de ADP e epinefrina, foram incluídos no estudo outros agonistas com diferentes alvos e vias de ativação plaquetária: AA, colágeno e PAF. É importante ressaltar que o AA por si só não é capaz de causar ativação plaquetária, entretanto, ele serve como substrato para a enzima COX1 plaquetária, que desencadeia a síntese de prostaglandinas. A enzima tromboxano sintetase por sua vez age sobre essas prostaglandinas, produzindo TXA₂, que é capaz de ativar plaquetas através de receptores acoplados à proteína G_q e G₁₃ (BROOS et al., 2011).

Como pode ser observado na Tabela 2, IDJ1 inibiu de forma significativa a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados. Quando comparadas as CI₅₀ encontradas para IDJ1 no presente trabalho (Tabela 3), observa-se que as CI₅₀ para ADP, epinefrina e PAF foram muito semelhantes, enquanto a de colágeno e AA foram a menor e a maior de todas, respectivamente. IDJ2, por sua vez, não foi capaz de inibir significativamente a agregação induzida por colágeno e PAF (Tabela 2), e, mesmo quando a inibição foi significativa, suas CI₅₀ foram maiores do que as calculadas para IDJ1. A compilação dos resultados permite concluir que o composto IDJ1 é um antiagregante mais potente quando comparado com IDJ2. Ao observar a estrutura propostas desses compostos (Figura 8), nota-se que a diferença entre eles é que IDJ1 é um homodímero, enquanto IDJ2 é um heterodímero, cujo dímero dois possui um grupamento metiltio no carbono 5 ao invés de uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5. Dessa forma, sugere-se que a diferença de potencial antitrombótico de IDJ1 e IDJ2 esteja relacionada com a presença da dupla ligação no dímero dois de IDJ1.

Não foram encontrados na literatura investigada outros trabalhos que avaliassem a atividade desses mesmos compostos ou de outros dissulfetos sobre a hemostasia humana. Contudo, um estudo realizado por Moura e cols. (2014) avaliou o efeito antiagregante de diterpenos isolados de *Dictyota menstrualis*. Nesse estudo, demonstrou-se que o dicotomatol,

um composto isolado dessa alga, inibiu a agregação induzida por colágeno de maneira concentração-dependente, com CI_{50} de 1060 μ M (MOURA et al., 2014), que é superior à encontrada para IDJ1 no presente estudo.

Ao avaliar os perfis das curvas de agregação gerada pelos agonistas, percebe-se que o tratamento com IDJ1 e IDJ2 inibiu a segunda onda de agregação, mas não interferiu com a primeira (Figura 13). A segunda onda observada nas figuras de porcentagem de transmitância de luz corresponde à etapa de amplificação de sinal, liberação do conteúdo de grânulos e agregação plaquetária (GURNEY, 2016). Dessa forma, o perfil apresentado pelas curvas sugere que as vias de amplificação de sinal pró-agregante podem estar sendo bloqueadas.

Como anteriormente mencionado, para que a agregação plaquetária ocorra, é necessária a ativação das vias mediadas por G_q e G_i , sendo que o ADP ativa esses dois mediadores via receptores $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$, respectivamente (PULCINELLI et al., 1999; WOULFE; YANG; BRASS, 2001; BROOS et al., 2011). O PAF os ativa através de seus receptores específicos, contudo a ação do PAF ocorre principalmente via G_q , e a via sinalização iniciada por G_i é considerada menor, o que torna esse agonista dependente da secreção de ADP (RAO et al., 1984; SINGH et al., 2013). Os receptores de epinefrina são capazes de ativar apenas G_i , e os receptores de TXA2 (gerado a partir do AA) se acoplam apenas à G_q , o que faz com que a agregação induzida por esses dois agonistas também seja dependente da secreção e da ação do ADP sobre os seus receptores (WOULFE; YANG; BRASS, 2001; BROOS et al., 2011). Os receptores de colágeno não são acoplados à proteína G, contudo eles são capazes de desencadear uma cascata de sinalização que, assim como G_q , ativa PLC. Dessa forma, o colágeno também necessita do ADP para auxiliar na ativação plaquetária (RIVERA et al., 2009; DAWOOD et al., 2012). Uma vez que todos os agonistas utilizados necessitam da ação de ADP sobre os receptores $P2Y$ para que ocorra uma completa ativação e agregação plaquetária, acredita-se que provavelmente, assim como EDJ e as frações, IDJ1 e IDJ2 estejam atuando sobre o receptor $P2Y_{12}$ e suas vias de sinalização.

Com a percepção de que os compostos isolados poderiam estar inibindo a agregação através do bloqueio das vias de ativação e secreção plaquetária, investigou-se se o tratamento das plaquetas com IDJ1 e IDJ2 diminuía a expressão de marcadores de ativação e secreção de plaquetas. Dessa forma, no presente trabalho, foi avaliado o efeito dos compostos isolados de *D. jolyana* na ativação de $GpIIb/IIIa$ (PAC1) e na expressão

membranas de P-selectina (CD62P) quando as plaquetas eram expostas ao ADP e a epinefrina.

A ativação e posterior degranulação plaquetária provoca a liberação de íons e proteínas na circulação sanguínea, enquanto este processo também altera a composição da membrana plaquetária e resulta na expressão superficial da P-selectina e um aumento no número de moléculas de receptor de integrina GpIIb/IIIa. A exposição da P-selectina se dá após a ativação plaquetária, sendo crucial para o recrutamento de leucócitos para locais de lesão vascular e a formação de agregados de leucócitos-plaquetas, enquanto também é importante para a interação plaquetária com o endotélio (STENBERG et al., 1985; KUTLAR; EMBURY, 2014). Após a ativação plaquetária, também ocorre a alteração da conformação do receptor GpIIb/IIIa (ativação), o que aumenta a sua afinidade por moléculas de fibrinogênio e facilita a agregação com plaquetas adjacentes por ligação ao fibrinogênio. Todos esses eventos estão associados com a segunda onda de agregação observada na agregometria (NIESWANDT, 2003; JACKSON, 2007; CIMMINO; GOLINO, 2013).

De maneira geral, os resultados mostraram que os compostos IDJ1 e IDJ2 inibiram em mais de 50 % a ativação da GpIIb/IIIa e a expressão membranar de P-selectina após o estímulo com ADP ou epinefrina (Figura 14). No entanto, estudos desse tipo com substâncias isoladas de algas marinhas não foram encontrados na literatura. No entanto, Kontogianni e cols. (2016) avaliaram o efeito de compostos isolados de folhas de *Olea europaea* L. na agregação plaquetária e na expressão de P-selectina e de GpIIb/IIIa ativada. Eles encontraram resultados um pouco inferiores, em que o eritrodiol, na concentração de 410 μ M, inibiu a agregação plaquetária em 42 %, a ligação com PAC1 em 22 % e a expressão de P-selectina em 31 % quando o ADP foi usado como agonista.

Os resultados de agregação plaquetária e citometria de fluxo sugerem que IDJ1 e IDJ2 são capazes de inibir a ativação, secreção e agregação plaquetária pela inibição das vias de sinalização de P2Y₁₂. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de investigar por quais mecanismos de sinalização intracelular IDJ1 e IDJ2 estariam atuando, bem como elucidar a relação entre esses mecanismos e a diferença estrutural dos compostos.

Devido à promissora atividade antiagregante de IDJ1 e IDJ2, considerou-se interessante verificar se eles tinham potencial para serem utilizados em testes *in vivo*. Dessa forma, foi avaliada a

hemocompatibilidade, a citotoxicidade e a biodisponibilidade oral desses compostos isolados.

As hemácias são um dos principais componentes sanguíneos e um dos primeiros elementos com que compostos ou substâncias entram em contato após administração sistêmica. Dessa forma, os ensaios de liberação de hemoglobina *in vitro* (teste de hemólise) foram utilizados para quantificar o efeito prejudicial que IDJ1 e IDJ2 teriam sobre a membrana dos eritrócitos. Segundo o *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials* (2008 apud BAUER et al., 2012), moléculas que causam uma hemólise de 0,0 - 2,0 % são classificadas como não hemolíticas, enquanto uma hemólise de 2,0 - 5,0 %, e uma maior que 5,0 % são classificadas como ligeiramente hemolíticas e hemolíticas, respectivamente. Dessa forma, quando IDJ1 e IDJ2 foram avaliados em concentrações próximas as de suas CI_{50} (500 μ M), IDJ1 foi classificado como não hemolítico ($1,4 \pm 0,1$ %) e IDJ2 como ligeiramente hemolítico ($2,6 \pm 2,7$ %). Apenas quando testados no dobro da sua CI_{50} (1000 μ M) é que eles geraram hemólises significativas. Os resultados indicam que IDJ1 é um candidato em potencial para a realização de ensaios *in vivo*, desde que utilizado em concentrações próximas a sua CI_{50} .

Outra importante avaliação que deve ser feita em compostos com potencial para serem utilizados em ensaios *in vivo* é se eles são citotóxicos para células saudáveis. Dessa forma, foi avaliada a viabilidade de células mononucleares após 24 horas de incubação com os compostos. Tanto IDJ1 quanto IDJ2 apresentaram um efeito citotóxico significativo na concentração de 1000 μ M (Figura 16). Contudo, medicamentos já empregados na clínica também apresentam tal efeito e isso não impediu a sua utilização. Maseneni e cols. (2012) demonstraram que o clopidogrel e a ticlopidina apresentam mielotoxicidade significativa a partir de concentrações de 10 μ M. Zahno e cols. (2013) avaliaram a hepatotoxicidade do clopidogrel e mostraram que esse apresentava efeito citotóxico significativo em células HepG2 que superexpressavam CYP3A4 em concentrações de 10 μ M ou mais. No presente estudo, os compostos isolados foram testados em concentrações muito superiores às avaliadas por Maseneni e cols. (2012) e por Zahno e cols. (2013). Dessa forma, apesar da citotoxicidade apresentada por IDJ1 e IDJ2, acredita-se que esses ainda possam ser testados *in vivo*.

A solubilidade e permeabilidade de IDJ1 e IDJ2 foram estimadas de acordo com alguns parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski e cols. (2001). A regra dos cinco de Lipinski estabelece alguns parâmetros

estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral de fármacos, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um determinado composto. Esta regra foi assim denominada, pois todos os valores envolvidos são múltiplos do número cinco (LIPINSKI et al., 2001).

De acordo com a regra, uma molécula candidata a fármaco será provavelmente ativa oralmente se apresentar 10 ou menos grupos aceptores de ligação hidrogênio (nON); cinco ou menos grupos doadores de ligação hidrogênio (nOHNH); se sua massa molecular (MM) for menor ou igual a 500 g/mol; e seu coeficiente de partição octanol-água (Clog P) menor ou igual a cinco (ou $\text{miLog P} \leq 4,15$). Quando um composto viola mais de um desses parâmetros, há uma alta probabilidade de que problemas de atividade serão encontrados (LIPINSKI et al., 2001). A “regra dos cinco” baseia-se na distribuição de propriedades calculadas entre diversos fármacos, entretanto alguns fármacos pertencentes a algumas classes como, antibióticos, glicosídeos cardíacos e vitaminas não cumprem esses requisitos. Diante disso, Lipinski e cols sugeriram em 2001 que essas poucas classes terapêuticas que violam a “regra dos cinco” contêm fármacos oralmente ativos devido a propriedades estruturais características de substratos para transportadores biológicos.

As moléculas de AAS e clopidogrel não violam nenhum dos cinco parâmetros, o que justifica o uso desses fármacos por via oral. As moléculas IDJ1 e IDJ2 violam apenas uma regra das cinco de Lipinski. Elas possuem miLogP maior do que 4,15 (Tabela 5), o que mostra que as moléculas de IDJ1 e IDJ2 são mais lipofílicas que hidrofílicas. Isso aponta que essas moléculas podem se ligar com maior facilidade as proteínas plasmáticas, e isso pode facilitar a distribuição do composto pelo organismo. O número de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, e a massa molecular estão em concordância com a regra. O peso molecular menor do que 500 também indica que essas moléculas podem ser facilmente transportadas e difundidas quando comparadas com moléculas maiores. Portanto, apenas uma violação não inviabilizaria o uso de IDJ1 e IDJ2, e por isso sugere-se que essas são moléculas com potencial biodisponibilidade oral.

Abordagens teóricas são estratégias importantes na etapa inicial nos estudos de novos fármacos. A avaliação teórica fornecida pelo programa Molinspiration é uma predição, no entanto os resultados obtidos reforçam que os compostos isolados estudados são moléculas potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos. Além disso, a partir desses resultados, pode-se sugerir o uso da estratégia

de modelagem molecular para realizar mudanças estruturais e assim aprimorar o perfil farmacológico e toxicológico desses compostos.

Por fim, os resultados do presente trabalho apontam que IDJ1 e IDJ2 isolados de *D. jolyana* não demonstraram ter efeito sobre a coagulação e apresentaram efeito antiplaquetário, sendo que esse efeito está provavelmente relacionado com a inibição de P2Y₁₂, o que gera uma menor ativação plaquetária. Do ponto de vista farmacológico, seria interessante uma molécula com alta atividade antiplaquetária, mas baixo efeito anticoagulante, ou que não atue sobre todas as vias da cascata da coagulação ou mecanismos de agregação plaquetária, pois seu risco de hemorragia seria reduzido, o que é desejável, uma vez que a hemorragia é um dos efeitos adversos mais importantes dos atuais medicamentos antitrombóticos (KEI et al., 2011; HOFFBRAND; MOSS, 2013). Por isso, uma molécula candidata ao desenvolvimento de um fármaco antitrombótico deve ter efeito antiplaquetário e/ou anticoagulante, mas também deve ser segura e não induzir efeitos adversos em seres humanos.

Dessa forma, apesar de serem necessários futuros estudos *in vitro* e *in vivo* para elucidar completamente o mecanismo de ação e os possíveis efeitos tóxicos de IDJ1 e IDJ2, os resultados do presente trabalho indicam que estas moléculas podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

7 CONCLUSÃO

A compilação dos resultados do presente estudo permite concluir que:

- EDJ não parece ter potencial anticoagulante, uma vez que não promoveu um prolongamento clinicamente relevante em TP e TTPa;

- O extrato bruto de *D. jolyana* (EDJ) apresenta atividade antiagregante, pois inibiu de maneira significativa a agregação plaquetária induzida por ADP e por epinefrina;

- Todas as frações inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina. A fração FDJ2 de *D. jolyana* foi a que apresentou menor atividade antiagregante para todos os agonistas, e FDJ5 foi a que melhor inibiu a agregação induzida por ADP;

- A fração FDJ1 foi considerada a mais promissora para dar continuidade às investigações, uma vez que, além de inibir significativamente a agregação plaquetária, também teve um bom rendimento e um perfil cromatográfico interessante;

- O composto isolado IDJ1 inibiu de forma significativa a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados, enquanto IDJ2 inibiu apenas a agregação induzida por ADP, epinefrina e AA;

- As CI_{50} de IDJ1 foram mais baixas que as de IDJ2, sendo que a do colágeno foi a menor de todas ($319,2 \pm 7,5 \mu M$);

- IDJ1 apresentou melhor atividade antiagregante do que IDJ2, e isso parece estar relacionado com a presença da dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 no dímero dois de IDJ1;

- Os compostos IDJ1 e IDJ2 inibiram em mais de 50 % a ligação com PAC1 e a expressão membranar de P-selectina após o estímulo com ADP e com epinefrina;

- IDJ1 e IDJ2 causaram baixa toxicidade sobre as hemácias, porém diminuíram significativamente a viabilidade de células mononucleares saudáveis em ensaios *in vitro*;

- Estudos *in silico* utilizando o *software* Molinspiration sugerem que as moléculas de IDJ1 e IDJ2 possuem biodisponibilidade oral segundo a “regra dos cinco” de Lipinski;

Com a realização desse trabalho, sugere-se que o efeito inibitório causado por IDJ1 e IDJ2 sobre a agregação plaquetária seja devido à interação desses compostos com os receptores $P2Y_{12}$, uma vez que a inibição da agregação parece estar envolvida com o impedimento do sistema de amplificação e sinergismo plaquetário. Estes resultados evidenciam a potencial utilização de moléculas provenientes de *D.*

jolyana como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar quais constituintes da fração FDJ5 são responsáveis por seu efeito antiagregante;
- Avaliar a secreção de grânulos densos com o teste da Mepacrina;
- Analisar a fosforilação das vias de sinalização relacionadas a P2Y₁₂ pela técnica de *Western Blotting*;
- Verificar a expressão de fosfatidilserina em plaquetas ativadas para verificar a ação de IDJ1 e IDJ2 sobre a ativação de P2Y₁₂;
- Estudar o efeito de IDJ1 e IDJ2 em ensaios com modelos de trombose *in vivo*;
- Realizar estudos de modelagem molecular e investigar a relação estrutura x atividade de IDJ1 e IDJ2.

REFERÊNCIAS

ANGIOLILLO, D. J.; FERREIRO, J. L. Platelet Adenosine Diphosphate P2Y₁₂ Receptor Antagonism: Benefits and Limitations of Current Treatment Strategies and Future Directions. **Revista Española de Cardiología (english Edition)**, Madrid, v. 63, n. 1, p. 60-76, 2010.

ARIENS, R. A. S. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 11, p. 294-305, 2013.

AZEVEDO, L. G. et al. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. **Comp Biochem and Physiol**. [s.l.], v. 147, p. 36-42, 2008.

BAGLIN, T. Clinical use of new oral anticoagulant drugs: dabigatran and rivaroxaban. **British. J Haematol**. London, v.163, p. 160-167, 2013.

BAUER, M. et al. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymerpoly(ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility. **Macromol Biosci**. Weinheim, v. 12, p. 986-998, 2012.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. Bioactive Marine Natural Products; **Anamaya Publishers**: New Delhi, India, 382p. 2005.

BIRIS, N. et al. Mapping the binding domains of the alphaIIb subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin alphaIIb beta3. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 270, n. 18, p.3760-3767, 2003.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.

BORN, G. V.; CROSS, M. J. Aggregation of blood platelets. **J Physiology**, Malden, v.168, p. 178-195, 1963.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **A Atenção Primária e as Redes de Atenção à Saúde/Conselho Nacional de Secretários de Saúde**. Brasília: CONASS, 127p. 2015. Disponível em:

<http://www.conass.org.br/biblioteca/pdf/A-Atencao-Primaria-e-as-Redes-de-Atencao-a-Saude.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopenias**. Brasília, DF, 2010.

BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Rev**, New York, v. 25, n. 4, p. 155-167, 2011.

CATALANI, E. et al. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. **Pharmacological Research**. [s.l.], v. 113, p. 409-420, 2016.

CATTANEO, M. P2Y12 receptors: structure and function. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 13, p. S10-S16. 2015.

CHAO, W.; OLSON, M. S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. **Biochemical Journal**. London, v. 292, p. 617-629, 1993.

CIMMINO, G.; GOLINO, P. Platelet biology and receptor pathways. **J Cardiovasc Transl Res**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 299-309, 2013.

CIRNE-SANTOS, C. C. et al. Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota pfaflii*. **Planta Med**. New York, v. 72, p. 295-299, 2006.

CLERCK, O. et al. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcL* and 26S ribosomal DNA sequence data analyses. **Journal of Phycology**, Moss Landing, v. 42, p. 1271-1288, 2006.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**. Oxford, v. 17, p. 541-552, 2007.

DAWOOD, B. B. et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and

validation of a streamlined agonist panel. **Blood**, [s.l.], v. 120, n. 25, p. 5041-5049, 2012.

DOMINGOS, T. F. S. et al. Anti-snake venom effect of secodolastane diterpenes isolated from Brazilian marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis* against *Lachesis muta* venom. **Rev Bras Farmacogn.** Curitiba, v. 21, p. 234-238, 2011.

DORSAM, R. T.; KUNAPULI, S. P. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 113, n. 3, p. 340-345, 2004.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FLEURY, B. G. et al. Polyphenols, terpenes and sterols in brazilian Dictyotales and Fucales (Phaeophyta). **Botanica Marina**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 457-462, 1994.

FOLEY, J. H. et al. Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. **J Thromb Haemost.** [s.l.], v.11, suppl.1, p. 306-315, 2013.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.34, p. 229-237, 2001.

FRENETTE, P. S. et al. P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-endothelial Interactions in vivo. **J Exp Med**, New York, v. 191, p. 1413-1422, 2000.

GHOSHAL, K.; BHATTACHARYYA, M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2014, p.1-16, 2014.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Rev**, New York, v. 29, n. 3, p. 153-62, 2015.

GUIRY, 2005. Algaebase. World electronic publication. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em 21 de dez.2017.

GURNEY, D. Platelet function testing: from routine to specialist testing. **British Journal of Biomedical Science**, [s.l.], v. 73, p. 10-20, 2016.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 68, n. 22- 24, p. 2831-2846, 2007.

HARRISON, P. et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 155, n. 1, p.30-44, 2011.

HINKE, R. K. Avaliação da atividade de compostos naturais e sintéticos sobre a homeostasia humana. 2016. 58p. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC, 2016.

HOFFBRAND A.V.; MOSS, P. A. H. *Fundamentos em Hematologia*. Tradução de Renato Failaca. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 454p. 2013.

JACKSON, S. P.; SCHOENWAEELDER, S. M. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 2, n. 10, p. 775-789, 2003.

JACKSON, S. P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, Washington, DC, v. 109, n.12, p. 5087-5095, 2007.

JIN, J.; KUNAPULI, S. P. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. **Proceedings National Academy Science**, Washington, DC, v. 95, n. 14, p. 8070–8074, 1998.

JONGARAMRUONG, J.; KONGKAM, N. Novel diterpenes with cytotoxic, anti-malarial and anti-tuberculosis activities from a brown alga *Dicotyota* sp. **J Asian Nat Prod Res**, [s.l.], v. 9, n. 6-8, p. 743-51, 2007.

KE, Z.; HUANG, Q. Haem-assisted dityrosine-cross-linking of fibrinogen under non-thermal plasma exposure: one important mechanism of facilitated blood coagulation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 26982, 2016.

KEI, A. A. et al. Review: Antiplatelet drugs: what comes next? **Clin Appl Thromb Hemost**. [s.l.], v. 17, p. 9–26, 2011.

KLEINEGRIS, M. C.; TEN CATE-HOEK, A. J.; TEN CATE, H. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. **Pol Arch Med Wewn**, Liszki, v. 122, n. 11, p. 557-66, 2012.

KHALID, E. B. et al. Natural products against cancer angiogenesis. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 37, n. 11, p. 14513-14536, 2016.

KICKLER, T. S. Platelet biology – an overview. **Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine**, [s.l.], v. 2, p. 79–85, 2006

KIM, S. Y. et al. Platelet Anti-Aggregation Activities of Compounds from *Cinnamomum cassia*. **J Med Food**. [s.l.], v. 13, n. 5, p. 1069–1074, 2010.

KIM, H. K. Antiplatelet, anticoagulant and fibrinolytic effects of *Litchi chinensis* Sonn. extract. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], p. 721-724, 2011.

KONTOGIANNI, V. G. et al. Deconvoluting the Dual Antiplatelet Activity of a Plant Extract. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 22, p. 4511-4521, 2016

KRIZ, N.; RINDER, C. S.; RINDER, H. M. Physiology of hemostasis: with relevance to current and future laboratory testing. **Clin Lab Med**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 159-74, 2009.

KROLL, M. H.; SCHAFER, A. I. Analysis if kugabd-receptor interactions. **Immunopharmacology of Platelets**, [s.l.], v. 1, p. 31-33, 1995.

KU, S. et al. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 53, p. 197-204, 2013.

KUTLAR, A.; EMBURY, S. H. Cellular Adhesion and the Endothelium. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 323-339, 2014.

LANDI, E. P.; MARQUES JÚNIOR, J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 39-46, 2003.

LAU, A. et al. Antiplatelet and anticoagulant effects of *Panax notoginseng*: Comparison of raw and steamed *Panax notoginseng* with *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 125, n. 3, p. 380-386, 2009

LEE, J. et al. Antithrombotic and antiplatelet activities of Soshiho-tang extract. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 130-137, 2013

LESLIE, M. Beyond Clotting: The Powers of Platelets. **Science**, [s.l.], v. 328, n. 5978, p. 562-564, 2010.

LI, N. et al. Mannich bases of scutellarein as thrombin-inhibitors: Design, synthesis, biological activity and solubility. **Bioorg Med Chem**. [s.l.], v. 20, p. 6919–6923, 2012.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**. [s.l.], v. 46, p. 3-26, 2001.

LIN, C.; BORENSZTAJN, K.; SPE, C. A. Targeting coagulation factor receptors – protease-activated receptors in idiopathic pulmonary fibrosis. **J Thromb Haemost**. [s.l.], v. 15, p. 597–607, 2017.

LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 100-206, 2005.

MARTINS, A. et al. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. **Mar. Drugs**. Basel, v. 12, p. 1066-1101, 2014.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The chemistry of algal secondary metabolism. In *Algal Chemical Ecology*; **Springer-Verlag**: Heidelberg, Germany, p. 1–20. 2008.

MASENENI, S. et al. Toxicity of clopidogrel and ticlopidine on human myeloid progenitor cells: Importance of metabolites. **Toxicology**, [s.l.], v. 299, n. 2-3, p. 139-145, 2012.

MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H. A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 23, p. 83-96, 2012.

MONTORO-GARCIA, S. et al. The Role of Platelets in Venous Thromboembolism. **Semin Thromb Hemost**, [s.l.], v. 42, n. 3, p. 242-51, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, L. A. et al. Antiplatelet and Anticoagulant Effects of Diterpenes Isolated from the Marine Alga, *Dictyota menstrualis*. **Mar. Drugs**, Basel, v. 12, n. 5, p. 2471-2484, 2014.

MOURA, L. A. et al. Evaluation of Marine Brown Algae and Sponges from Brazil as Anticoagulant and Antiplatelet Products. **Mar. Drugs**, Basel, v. 0, n. 8, p. 1346-1358, 2011.

NEIVA, T. J. C et al. Antiplatelet activity of *Croton celditifolius*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 44, n. 1, p. 127-132, 2008

NIESWANDT, B. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?. **Blood**, Washington, DC, v. 102, n. 2, p. 449-461, 2003.

NUNES, J. M. C.; PAULA, E. J. O gênero *Dictyopteris* J.V. Lamour. (Dictyotaceae - Phaeophyta) no estado da Bahia, Brasil.

Hidrobiológica, Cidade do México, v. 16 n. 3, p. 251-258, 2006.

PULCINELLI, F. M et al. Concomitant activation of Giprotein-coupled receptor and protein kinase C or phospholipase C is required for platelet aggregation. **Febs Letters**, [s.l.], v. 460, n. 1, p. 37-40. 1999.

RAMAKRISHNAN, A. V. K. P. et al. Platelet activating factor: A potential biomarker in acute coronary syndrome?. **Cardiovascular Therapeutics**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 64-70, 2017.

RAO, A. K. et al. Platelet-activating factor is a weak platelet agonist: Evidence from normal human platelets and platelets with congenital secretion defects. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.153-165, 1984.

RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, Birmingham, v. 12, p. 261-273, 2001.

REZENDE, S. M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, p. 534-553, 2010.

RIVERA, J. et al. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. **Haematologica**, [s.l.], v. 94, n. 5, p. 700-711, 2009.

ROBERT, S. et al. Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 128, n. 3, p. 641-648, 2010.

SAVAGE, B.; ALMUS-JACOBS, F.; RUGGERI, Z. M. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. **Cell**, Cambridge, v. 94, p. 657-666, 1998

SILBERFELD, T.; ROUSSEAU, F.; REVIERS, B. An updated classification of brown algae (Ochrophyta, Phaeophyceae). **Cryptogamie Algologie**, Paris, v. 35, n. 2, p. 117-156, 2014.

SINGH, P. et al. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 84, p. 180-201, 2013.

SURIN, W. R. et al. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anticoagulant drugs. **J Pharm Toxic Methods**, [s.l.], v. 61, p. 287–291, 2010.

SIAMOPOULOU, P. et al. Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 65, n. 14, p. 2025-2030, 2004.

SMITH, S. A.; TRAVERS, R. J.; MORRISSEY, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 326-336, 2015.

STENBERG, P. E. et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. **J Cell Biol**, New York, v. 101, p. 880–886, 1985.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista virtual de química**, 2013. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/346>>. Acesso em: 10 Mar. 2017

TRIPLETT, D. A.; HARMS, C. S.; KOEPKE, J. A. The effect of heparin on the activated partial thromboplastin time. **Am J Clin Pathol**, [s.l.], v. 70, n. 3, suppl. 3, p. 556-559, 1978

VALLIM, M. A. et al., The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 33, p. 1-16, 2005.

WALLE, G. R. et al. Two Functional Active Conformations of the Integrin $\alpha 2\beta 1$, Depending on Activation Condition and Cell Type. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, n. 44, p. 36873-36882, 2005

VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 327-358, 2013.

WANG, J. et al. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **Eur J Pharm Sci**, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 138-146, 2009.

WEITZ, J. I.; EIKELBOOM, J. W. Advances in Thrombosis and Hemostasis. **Circulation Research**, [s.l.], v. 118, n. 9, p. 1337-1339, 2016.

WEYRICH, A. S.; LINDEMANN, S.; ZIMMERMAN, G. A. The evolving role of platelets in Inflammation. **J Thromb Haemost.** [s.l.], v. 1, n. 9, p. 1897-1905, 2003.

WOULFE, D.; YANG, J.; BRASS, L. ADP and platelets: the end of the beginning. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 107, n. 12, p. 1503-1505, 2001.

ZAHNO, A. et al. Hepatocellular toxicity of clopidogrel: Mechanisms and risk factors. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 65, p. 208-216, 2013.

ZAPATA, J. C.; COX, D.; SALVATO, M. S. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. e2858, 2014.

ZATELLI, G. A.; PHILLIPUS, A. C.; FALKENBERG, M. An overview of odoriferous marine seaweeds of the *Dictyopteris* genus: insights into their chemical diversity, biological potential and ecological roles. **Rev. Bras. Farmacogn.** Curitiba, No prelo, 2018.

ZIMMERMAN, G. A. et al. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. **Crit Care Med**, Mount Prospect, v. 30, n. 5 Suppl, p. S294-301, 2002.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de Mecanismos Trombóticos e Antitrombóticos em Indivíduos Adultos

Pesquisador: Ana Carolina Rabello de Moraes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 32934714.0.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 831.351

Data da Relatoria: 13/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto do Departamento de Análises Clínicas intitulado Análise de Mecanismos Trombóticos e Antitrombóticos em Indivíduos Adultos

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar mecanismos trombóticos e antitrombóticos em indivíduos adultos com e sem história clínica ou familiar de trombofilia.

Objetivo Secundário:

- Estudar o efeito de compostos sobre a agregação plaquetária;- Avaliar a ação de compostos sobre a coagulação sanguínea humana;- Verificar a prevalência de anormalidades que predisõem à trombofilia em indivíduos adultos saudáveis e em pessoas com história clínica e familiar de trombofilia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Sim, existem os riscos de procedimentos de coleta de sangue, possíveis constrangimentos durante a entrevista e/ou quebra de confidencialidade dos dados coletados. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: A coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e pela equipe da pesquisa que tomará todos os cuidados necessários para que o (a)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900

UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-9206

Fax: (48)3721-9696

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 831.351

Senhor(a) tenho o mínimo de desconforto. Apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe da pesquisa tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. A entrevista para a coleta de algumas informações (uso de

medicamentos, realização de exercícios físicos e histórico familiar) será realizada em ambiente tranquilo e discreto, sempre respeitando a individualidade e as necessidades de cada paciente. Será assegurado o direito a não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados retirados do prontuário médico serão armazenados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

Benefícios:

Os participantes talvez não tenham benefício imediato com o estudo, entretanto com a conclusão desse trabalho será determinada a prevalência das anormalidades que predisõem à trombofilia na população do município de Florianópolis, uma informação que atualmente é desconhecida e que poderá auxiliar os clínicos no manejo dos pacientes com tendência à trombose. Além disso, também se espera que ao fim desse trabalho sejam identificados novos compostos com propriedades terapêuticas e que representem um avanço em direção ao desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto mostra-se adequado teórica e metaodologicamente para ser executado na prática

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os documentos para submissão e avaliação no CEP SH UFSC Relatório, Projeto, Declaração Instituição, TCLE, Cronograma, Folha de Rosto

Recomendações:

Embora o pesquisador tenha adequado o TCLE recomendamos que coloque no texto do TCLE que o projeto atende a Resolução 466/2012 CNS/MS e conta com aprovação do CEP SH/UFSC endereço email e telefone do CEP que o TCLE SERÁ IMPRESSO EM DUAS VIAS ASSINADAS E RUBRICADAS FICANDO uma em poder do participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Concluo indicando aprovação sugerindo que o pesquisador atenda a recomendação de inserir no

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 831.351

texto as informações sugeridas pelo relator.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 14 de Outubro de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

ANEXO B – Trabalhos Apresentados em Congressos



CERTIFICADO

HEMO 2017

Certificamos que o trabalho intitulado "EFEITO DE EXTRATOS BRUTOS DE ALGAS DOS GÊNEROS *DICTYOTA* E *DICTYOPTERIS* SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA" de autoria de Synouze SM, Souza RK, Uliana CB, Philippus AC, Zatzli GA, Horta PA, Falkenberg MB, Moraes ACR foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hematopatologia e Terapia Celular 2017, realizado no período de 8 a 11 de novembro, na categoria oral.

Curitiba, 11 de novembro de 2017.



DIANA TAVOLI CORNAS
 PRESIDENTE HEMO 2017
 PRESIDENTE ABHH

[Signature]
 RICARDO PASQUELI
 PRESIDENTE HEMO DO HEMO 2017



CERTIFICATE

The Organizing Committee verifies that the contribution:

PP73 entitled "Antithrombotic and anticoagulant activity of the Brazilian brown alga *Dictyopteris jolyana*" by Gabriele A. Zatelli, Stephanie Millis Syracuse, Ana Cláudia Philippus, Marina N. Sissini, Paulo A. Horta, Ana Carolina R. de Moraes, and Miriam Falkenberg was presented as POSTER COMMUNICATION at the 10th European Conference on Marine Natural Products (ECMNP2017) that took place from September 3rd to September 7th, 2017 at the Orthodox Academy of Crete in Kolymbari, Crete (Greece).

On behalf of the Organizing Committee

Ass. Prof. Efstathia IOANNOU

Prof. Vasilios ROUSSIS