



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

NATHALIA MOURA MEYER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITROMBÓTICO E ANTICOAGULANTE DE
EXTRATOS BRUTOS DE ALGAS MARINHAS E SEUS COMPOSTOS
ISOLADOS**

FLORIANÓPOLIS

2019

Nathalia Moura Meyer

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITROMBÓTICO E ANTICOAGULANTE DE
EXTRATOS BRUTOS DE ALGAS MARINHAS E SEUS COMPOSTOS
ISOLADOS**

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

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

Florianópolis

2019

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

Meyer, Nathalia Moura

Avaliação do efeito antitrombótico e anticoagulante de extratos brutos de algas marinhas e seus compostos isolados. / Nathalia Moura Meyer ; orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes, 2019.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Hemostasia. 4. Agregação plaquetária. 5. Compostos naturais. I. Moraes, Ana Carolina Rabello de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Nathalia Moura Meyer

“Avaliação do efeito antitrombótico e anticoagulante de extratos brutos de algas marinhas e seus compostos isolados”.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Dr(a). Lilian Sibelle Campos Bernardes

Prof. Dr. Celso Spada

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Prof(a). Dr(a). Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

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

Florianópolis, 04 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Nara (*in memoriam*) que sempre foi a minha maior incentivadora e apesar de todas as dificuldades, nunca mediu esforços para me proporcionar uma educação de qualidade. Agradeço por todo amor, apoio e dedicação nos 32 anos que convivemos juntas. E ainda por ter compartilhado comigo o amor que você tinha pela docência. Você sempre será uma inspiração pra mim e faz muita falta na minha vida!

Ao meu esposo Michael, por toda compreensão, companheirismo e amores nos anos. Por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e também nas maiores felicidades. Agradeço por fazer de mim uma mulher melhor a cada dia, sempre me incentivando a ir em busca dos meus sonhos! Ao meu filho Pedro, que foi meu maior presente! Agradeço, filho, por ter a honra de ser escolhida para ser sua mãe! Meus meninos, Michael e Pedro, amo vocês incondicionalmente!

À minha orientadora, Professora Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes, por toda dedicação, apoio e pelos ensinamentos durante esse período. Agradeço principalmente por toda paciência e por entender que como mãe, muitas vezes tive que deixar o trabalho de lado em prol do meu filho.

Às minhas colegas de bancada, Stephanie, Bianca, Tanara e Bruna, pela amizade e parceria. Por dividirem seus conhecimentos e caminharem essa jornada juntamente comigo. A todos os colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, pelo carinho e acolhimento e por toda a amizade construída nesse período. À Professora Dra. Maria Cláudia Santos da Silva, pela disponibilidade do laboratório para que os experimentos fossem realizados.

À Professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg e as doutorandas Ana Cláudia Philippus e Gabriele Andressa Zatelli, pela colaboração, fornecendo os compostos testados nesse trabalho. Agradeço a disponibilidade e auxílio.

À chefia e aos colaboradores do Banco de Sangue do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, pela disponibilidade na coleta das amostras dos doadores, sem isso, esse trabalho não seria possível.

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 colaborarem financeiramente com este trabalho.

Enfim, este trabalho só pôde ser realizado com a colaboração e apoio de vocês.

Muito Obrigada!

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”
(Claude Lévi-Strauss)*

RESUMO

A hemostasia é um processo fisiológico que consiste em um equilíbrio entre proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes. Distúrbios nos mecanismos hemostáticos podem ocasionar eventos tromboembólicos. A trombose é uma complicação de alta incidência, morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo. Atualmente, diversos medicamentos são utilizados para a prevenção e o tratamento da trombose, porém ainda existem muitos efeitos adversos associados a sua utilização, o que limita o seu uso universal. Portanto, há a necessidade de novas terapias, com melhor custo-benefício e menos reações adversas. Nesse contexto, compostos de origem natural, com boa atividade sobre a hemostasia, podem representar um avanço tecnológico nas terapias anticoagulantes e antitrombóticas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de extratos brutos de algas marinhas pardas e de seus compostos isolados sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana. A ação sobre a coagulação foi analisada pelo tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A atividade antiagregante foi avaliada por turbidimetria usando difosfato de adenosina (ADP), epinefrina, ácido araquidônico (AA) e colágeno como agonistas. Previamente a realização dos ensaios, o plasma rico ou pobre em plaquetas foi incubado a 37 °C com os extratos brutos ou os compostos isolados. Dos 27 extratos brutos avaliados, apenas um extrato de *Dictyopteris jolyana* prolongou significativamente o TTPa. No entanto, 15 extratos brutos inibiram significativamente da agregação plaquetária induzida por ADP e/ou epinefrina. A partir da triagem com os extratos, selecionaram-se cinco compostos isolados deles (DJ12, DJ13, DJ14, DJ17 e AP1) para verificar seu efeito sobre a hemostasia. Nenhum composto apresentou efeito anticoagulante, e quatro inibiram significativamente a agregação induzida por ADP e/ou epinefrina. O composto AP1, isolado da alga marinha parda *Desmarestia menziesii* J. Agardh, apresentou os melhores resultados e por isso foi selecionado para dar continuidade às investigações. Quando o ADP foi utilizado como agonista, a CI_{50} de AP1 foi de $201,8 \pm 6,4 \mu\text{M}$, frente à epinefrina foi de $239,7 \pm 9,0 \mu\text{M}$, ao AA foi de $207,5 \pm 6,6 \mu\text{M}$ e ao colágeno foi de $156,9 \pm 5,4 \mu\text{M}$. A avaliação do perfil da curva de agregação sugeriu que AP1 interfere nos mecanismos relacionados com a resposta exógena da plaqueta, visto que inibiu parcialmente a primeira onda de agregação. Segundo o método de exclusão por azul de trypan, AP1 diminuiu em menos de 5% a viabilidade das plaquetas. A avaliação da expressão membranar de P-selectina e de GpIIb/IIIa ativa por citometria de fluxo demonstrou que AP1 inibiu a ativação plaquetária, uma vez que diminuiu em quase 100% a expressão de ambos marcadores. Ainda constatou-se que na concentração de $500 \mu\text{M}$, AP1 era citotóxico para células mononucleadas sanguíneas. Contudo, AP1 apresentou-se fracamente hemolítico até a concentração de $720 \mu\text{M}$. Segundo as regras de Lipinski e Veber, AP1 pode apresentar boa biodisponibilidade oral. Conclui-se que AP1 pode ser utilizado como protótipo para o desenvolvimento de um novo medicamento antitrombótico, uma vez que apresentou significativo efeito antiagregante, não afetou a viabilidade plaquetária, apresentou fraca atividade hemolítica e boa biodisponibilidade oral.

Palavras-chave: antiagregante, anticoagulante, plaqueta, compostos naturais, alga parda, *Desmarestia menziesii*.

Antithrombotic and anticoagulant effect of algae's crude extracts and its isolated compounds

Hemostasis is a physiological process consisting of a balance between procoagulant and anticoagulant proteins. Disturbances in hemostatic mechanisms can lead to thromboembolic events. Thrombosis is a complication of high incidence, morbidity and mortality in Brazil and in the world. Currently, several drugs are used for the prevention and treatment of thrombosis, but there are still many adverse effects associated with its utilization, which limits its universal use. Therefore, there is a need of new therapies, with better cost-benefit and less adverse reactions. In this context, compounds of natural origin, with good activity on hemostasis, may represent a technological advance in anticoagulant and antithrombotic therapies. The aim of this study was to evaluate the effect of crude extracts of brown marine algae and their isolated compounds on platelet aggregation and blood coagulation. The effect on coagulation was evaluated by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). The antiplatelet activity was evaluated by turbidimetry using adenosine diphosphate (ADP), epinephrine, arachidonic acid (AA) and collagen as agonists. Prior to the assays, rich or platelet-poor plasma was incubated at 37 °C with the crude extracts or the isolated compounds. Of the 27 crude extracts evaluated, only one extract of *Dictyopteris jolyana* significantly prolonged the TTPa. However, 15 crude extracts significantly inhibited platelet aggregation induced by ADP and/or epinephrine. From the screening with the crude extracts, five compounds isolated from them (DJ12, DJ13, DJ14, DJ17 and AP1) were selected to verify their effect on hemostasis. No compound had anticoagulant effect, and four significantly inhibited ADP and/or epinephrine-induced aggregation. The compound AP1, isolated from the brown algae *Desmarestia menziesii* J. Agardh, presented the best results and was therefore selected to continue the investigations. When ADP was used as an agonist, the IC₅₀ of AP1 was 201.8 ± 6.4 μM, for epinephrine it was 239.7 ± 9.0 μM, for AA it was 207.5 ± 6.6 μM and for collagen it was 156.9 ± 5.4 μM. The evaluation of the profile of the aggregation curve suggested that AP1 interferes in the mechanisms related to the exogenous platelet response, since it partially inhibited aggregation's first wave. According to the blue trypan exclusion method, AP1 decreased the platelet viability by less than 5%. Evaluation of P-selectin and active GpIIb/IIIa membrane expression by flow cytometry demonstrated that AP1 inhibited platelet activation, as it decreased the expression of both markers by almost 100%. It was further found that at the concentration of 500 μM, AP1 was cytotoxic to blood mononuclear cells. However, AP1 was poorly hemolytic up to the concentration of 720 μM. According to the rules of Lipinski and Veber, AP1 may have a good oral bioavailability. It is concluded that AP1 can be used as a prototype for the development of a new antithrombotic drug, since it presented a significant antiplatelet effect, did not affect platelet viability, and presented poor hemolytic activity and good oral bioavailability.

Keywords: antiplatelet, anticoagulant, platelet, natural compounds, brown algae, *Desmarestia menziesii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de ativação plaquetária.	23
Figura 2 - Representação esquemática da cascata da coagulação.	25
Figura 3 - Estruturas químicas dos antiplaquetários.....	29
Figura 4 - Alvos celulares para fármacos antiplaquetários.	27
Figura 5 - Estruturas químicas dos anticoagulantes.	31
Figura 6 - Estrutura química proposta dos compostos isolados.	38
Figura 7 - Estratégia de análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo.....	42
Figura 8 - Efeito dos compostos isolados (500 µM) sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 6 µM).	49
Figura 9 - Efeito dos compostos isolados (500 µM) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina (6 µM).	49
Figura 10 - Efeito do composto AP1 (500 µM) sobre o perfil e agregação plaquetária induzida pelos agonistas difosfato de adenosina (ADP - 6 µM), epinefrina (EPI - 6 µM), ácido araquidônico (AA - 500 µM) e colágeno (COL - 2 µg/mL).....	52
Figura 11 - Curvas de agregação plaquetária induzida pelos agonistas em função da concentração de AP1.	53
Figura 12 – Efeito de AP1 sobre a expressão membranar da GpIIB/IIIa ativada (PAC-1) e de P-selectina (CD62P) em plaquetas estimuladas por ADP.	55
Figura 13 - Efeito hemolítico de AP1 em diferentes concentrações.	56
Figura 14 - Efeito citotóxico de AP1 (500 µM) sobre células mononucleadas de indivíduos clinicamente saudáveis.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados sobre coleta e identificação das espécies de algas marinhas.....	37
Tabela 2 - Efeito dos extratos brutos de algas sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (6 μ M) e epinefrina (6 μ M).....	46
Tabela 3 - Efeito dos extratos brutos de algas sobre a coagulação sanguínea.....	47
Tabela 4 - Efeito dos compostos isolados (500 μ M) sobre a coagulação sanguínea.....	48
Tabela 5 - Efeito do composto AP1 (500 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA - 500 μ M) e colágeno (COL - 2 μ g/mL).	50
Tabela 6 - Propriedades estruturais de AP1, AAS e clopidogrel calculadas utilizando Molinspiration Cheminformatics.....	58

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de plaquetas viáveis.....	40
Equação 2 - Cálculo da taxa de hemólise.....	44
Equação 3 - Cálculo da porcentagem de inibição a partir da Intensidade de Fluorescência Média (IFM).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido araquidônico
- AAS – Ácido acetilsalicílico
- AC – Adenilato ciclase
- ADP – Do inglês *Adenosine diphosphate*
- AMPc – Do inglês *Cyclic adenosine monophosphate*
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AP-t – Ativador de plasminogênio tecidual
- AVC – Acidente vascular cerebral
- AVK – Antagonista da vitamina K
- CI₅₀ – Concentração inibitória 50%
- COX-1 – Ciclooxigenase-1
- DAG – Diacilglicerol
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DOAC – Do inglês *Direct Oral Action Anticoagulant*
- DP – Desvio padrão
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EP – Embolia pulmonar
- F – Fator
- FA – Fibrilação atrial
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FSC – Do inglês *Forward scatter*
- FT – Fator tecidual
- FvW – Fator von Willebrand
- Gp – Glicoproteína
- HBPM – Heparina de baixo peso molecular
- IFM – Intensidade de Fluorescência Média
- IP₃ – Trifosfato inositol
- IP₃ – Receptor de trifosfato inositol
- Milog - Coeficiente de partição octanol-água
- MM – Massa molecular
- MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5
- NO – Óxido nítrico

nON – Número de grupamentos aceptores de ligação de hidrogênio
nOHNH – Número de grupamentos doadores de ligação de hidrogênio
N rotb – Número de ligações rotacionáveis
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAR – Receptor de proteína ativada
PBS – Tampão fosfato-salino
PGG₂ – Prostaglandina G₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PI₃K – Fosfoinositideo 3 quinase
PIP₂ – Fosfatidilinositol bifosfato
PKC – Proteína quinase C
PKA – Proteína quinase A
PLC – Fosfolipase C
PPP – Plasma pobre em plaquetas
PRP – Plasma rico em plaquetas
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*
SCA – Síndrome coronariana aguda
SSC – Do inglês *Side scatter*
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TEV – Tromboembolismo venoso
TP – Tempo de protrombina
TPSA – Área de superfície polar topológica
TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP – Tromboembolismo venoso profundo
TXA₂ – Tromboxano A₂
VASP – Proteína estimulada por vasodilatador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 HEMOSTASIA	21
3.1.1 Hemostasia Primária	21
3.1.2 Hemostasia Secundária	24
3.1.3 Fibrinólise	25
3.2 TROMBOSE.....	26
3.3 TERAPIAS PREVENTIVAS E DE TRATAMENTO PARA TROMBOSE	26
3.4 COMPOSTOS NATURAIS	32
4 METODOLOGIA	34
4.1 PRINCIPAIS REAGENTES E EQUIPAMENTOS	34
4.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES E COLETA DAS AMOSTRAS	35
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E COMPOSTOS ISOLADOS	35
4.3.1 Extratos brutos	35
4.3.2 Compostos isolados	38
4.4 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	38
4.5 ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	39
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE PLAQUETÁRIA.....	40
4.7 ENSAIOS DE POTENCIAL DE HEMÓLÍTICO	41
4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS SANGUÍNEAS HUMANAS	44
4.9 EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P- SELECTINA	41
4.10 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL.....	45
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS	46
5.1 ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS DE ALGAS MARINHAS SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA	46

5.2	ATIVIDADE DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE ALGAS MARINHAS SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA.....	48
5.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AP1 SOBRE AS PLAQUETAS ..	50
5.4	ATIVIDADE DE AP1 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA) E COLÁGENO	50
5.5	EFEITO DE AP1 SOBRE OS PERFIS DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO.....	50
5.6	DETERMINAÇÃO DA CI ₅₀	53
5.7	ATIVIDADE DE AP1 SOBRE A EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA	54
5.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO	55
5.9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AP1 EM CÉLULAS MONONUCLEADAS HUMANAS.....	56
5.10	PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL DE AP1	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	68
8	PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos	79

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos últimos 15 anos, as principais causas de óbitos no mundo são as doenças cardíacas isquêmicas e derrames. No ano de 2016, essas doenças foram responsáveis por 15,2 milhões de mortes (WHO, 2018). No Brasil, em 2017, as doenças cardiovasculares representavam a primeira causa de óbitos em indivíduos com mais de 40 anos de ambos os sexos (BRASIL, 2018). Nesse contexto, evidências têm demonstrado que distúrbios da hemostasia, como hiperagregação plaquetária, aumento da atividade de fator de coagulação e diminuição da capacidade fibrinolítica, podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (AMIROU *et al.*, 2018; FAVALORO; LIPPI, 2018; KARSENTY *et al.*, 2018; McEWEN, 2015).

A hemostasia é um processo fisiológico que envolve as plaquetas, os vasos sanguíneos, as proteínas da coagulação e fibrinolíticas, e os anticoagulantes naturais. Ela tem como objetivo manter a fluidez do sangue nos vasos sanguíneos, de modo a evitar possíveis hemorragias após um dano vascular, ou trombozes espontâneas (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; REIS *et al.*, 2003).

Didaticamente, o sistema hemostático é dividido em três fases: hemostasia primária (interação entre plaquetas e vasos); hemostasia secundária (coagulação sanguínea) e fibrinólise (dissolução do coágulo) (FAVALORO; LIPPI, 2018). Após a lesão vascular, ocorre ativação das plaquetas e do sistema de coagulação, o que leva à formação de um tampão plaquetário e/ou coágulo que impede a perda sanguínea. Uma vez que o tecido lesionado se reconstitui, ocorre a fibrinólise que irá dissolver o coágulo e permitir o reestabelecimento do fluxo sanguíneo. Quando algum desses processos é interrompido ou prejudicado devido a anormalidades hereditárias ou adquiridas, a hemostasia é ineficiente e pode resultar em eventos hemorrágicos ou complicações tromboembólicas (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; VERSTEEG *et al.*, 2013).

Como as plaquetas e a coagulação desempenham um papel fundamental na patogênese dos eventos tromboembólicos, a utilização de medicamentos antiagregantes e anticoagulantes é essencial para a prevenção de tais eventos (SILVA *et al.*, 2013). Dentre os fármacos mais utilizados na prática clínica, cita-se o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel, que são antiagregantes; e os antagonistas da vitamina K e inibidores indiretos do fator X ativado (FXa), que atuam como anticoagulantes (FAVALORO; LIPPI, 2018). O AAS é o antiplaquetário mais comumente utilizado na

prevenção primária em indivíduos idosos e é recomendado por diversas diretrizes (FEITOSA-FILHO *et al.*, 2019; McEVOY *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2013). O AAS atua inibindo a síntese de tromboxano A2 (TXA2) pelas plaquetas e pode ser utilizado em terapia combinada com outro medicamento antiagregante. Apesar de sua comprovada eficácia, estudos anteriores sugerem que cerca de 50% dos pacientes com doença aterosclerótica são resistentes à terapia com AAS (GUIRGIS; THOMPSON; JANSEN, 2017; PATEL *et al.*, 2019; TANTRY *et al.*, 2018).

Já o clopidogrel representa a segunda geração de uma classe de medicamentos denominada tienopiridínicos, que são inibidores do receptor P2Y12 por prevenirem seletiva e irreversivelmente a ligação da difosfato de adenosina (ADP) a esse receptor. Atualmente, o clopidogrel é o membro mais utilizado dessa classe de fármacos e, juntamente com o AAS, forma a terapia de escolha para prevenção secundária de eventos isquêmicos recorrentes em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) (FEITOSA-FILHO *et al.*, 2019). No entanto, estudos relatam que há uma variabilidade na resposta ao clopidogrel como resultado de múltiplos fatores, incluindo idade, diabetes mellitus, interações medicamentosas e polimorfismos genéticos (BERGER, 2018). Outro fator que limita a sua utilização é que se estima que 30% da população mundial apresente algum grau de resistência ao clopidogrel (FEITOSA *et al.*, 2018).

No âmbito dos anticoagulantes, a heparina foi o primeiro anticoagulante utilizado clinicamente e, após mais de 100 anos da sua descoberta, continua sendo o anticoagulante mais usado, embora sua utilização seja limitada à administração parenteral, o que dificulta a adesão ao tratamento (CARVALHAL *et al.*, 2019). A heparina teve sua molécula modificada por meio de clivagem química ou enzimática, gerando as heparinas de baixo peso molecular (HBPM), que também atuam como anticoagulantes, porém com benefícios comparados a molécula original, tais como biodisponibilidade adequada por via subcutânea, farmacocinética mais previsível e menos efeitos adversos (VILANOVA *et al.*, 2016). A partir de 1950, a varfarina e outros antagonistas da vitamina K (AVK) têm sido o pilar da terapia para pacientes com fibrilação atrial (FA) e tromboembolismo venoso (TEV) (FEITOSA-FILHO *et al.*, 2019). Embora os AVK sejam relativamente baratos, eles possuem uma janela terapêutica estreita, exigem monitoramento frequente, apresentam interações com alimentos e medicamentos, o que termina por resultar em baixa adesão ao tratamento. Alternativamente a essa terapia, o *Food and Drug Administration* (FDA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovaram para uso uma nova classe de

fármacos, os anticoagulantes orais de ação direta (DOAC), sendo a dabigatrana, a rivaroxabana e a apixabana os mais utilizados atualmente. Esses medicamentos não exigem monitoramento laboratorial e possuem menos interações medicamentosas. No entanto, as principais preocupações sobre os DOACs incluem custo, risco de sangramento e ausência atual de um antídoto específico (PETERSON *et al.*, 2019). Como pode ser visto, apesar da criação e modulação de novas moléculas, os medicamentos atualmente existentes para o tratamento e profilaxia de eventos tromboembólicos ainda apresentam limitações associadas ao seu uso, como importantes e variadas interações medicamentosas e alimentares, estreita janela terapêutica, efeitos adversos importantes como sangramentos, desenvolvimento de resistência e possível toxicidade (BERGER, 2018; CARVALHAL *et al.*, 2019; FEITOSA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2017; TANTRY *et al.*, 2018). Considerando as limitações terapêuticas existentes e, associando ao fato de que as doenças cardiovasculares são uma das principais causas de óbito no Brasil e no mundo (BRASIL, 2015; REIS *et al.*, 2003), fica evidente a necessidade da busca de novas moléculas com atividade promissora sobre a hemostasia e que sejam mais eficazes, seguras e com melhor custo-benefício do que as atualmente disponíveis no mercado para uso (PEREIRA *et al.*, 2017).

A OMS estima que aproximadamente 80% da população mundial usa a medicina tradicional para as suas necessidades básicas de saúde e a maior parte dessa terapia envolve o uso de extratos de plantas ou compostos ativos de plantas. Ao longo da história, as plantas têm sido usadas para fins de cura e formam a origem da medicina moderna (McEWEN, 2015). Nas últimas décadas, estudos tem demonstrado que compostos naturais, incluindo os de origem marinha, têm potencial biotecnológico na indústria e na medicina, apresentando variadas atividades, como antiplaquetária (BADIMON, VILAHUR, 2013), anticoagulante (MOURA *et al.*, 2011), citotóxica (ALVES *et al.*, 2018), antiparasitária (GARCIA-DAVIS *et al.*, 2018), entre outras. As fontes marinhas proporcionam estruturas químicas únicas e incomuns, devido à exposição a ambientes diversos e hostis, estimulando a síntese de metabólitos secundários biologicamente ativos. As algas e invertebrados são as fontes marinhas mais abundantes de novos compostos antitrombóticos, produzindo tanto macromoléculas, como polissacarídeos, quanto pequenas moléculas, como peptídeos, terpenos, alcalóides, polifenóis, etc. Embora nos últimos anos os polissacarídeos tenham sido identificados como os metabólitos mais explorados terapeuticamente como novos agentes antitrombóticos, as moléculas pequenas provaram ser também um excelente

ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos e com um diferencial, são oralmente eficazes (CARVALHAL *et al.*, 2019). Portanto, compostos de origem natural que possuam boa atividade sobre a hemostasia humana podem representar um avanço tecnológico considerável na obtenção de novos fármacos antiagregantes ou anticoagulantes, que auxiliem na prevenção e tratamento de eventos tromboembólicos da população em geral (KU *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de extratos brutos de algas marinhas pardas e de seus compostos isolados sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos dos extratos brutos sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina;
- Avaliar os efeitos dos extratos brutos sobre os tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa);
- Selecionar os extratos brutos com melhor atividade antiagregante e verificar o efeito de seus compostos isolados sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina, e sobre o TP e TTPa;
- Selecionar o composto isolado com melhor atividade sobre a hemostasia e avaliar o seu efeito sobre a viabilidade de plaquetas provenientes de indivíduos clinicamente saudáveis;
- Selecionar o composto isolado com melhor atividade antiagregante e verificar sua atividade sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA) e colágeno;
- Determinar a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do composto selecionado frente à agregação plaquetária;
- Investigar o efeito do composto isolado selecionado sobre a expressão membranar de GpIIb/IIIa ativada e de P-selectina;
- Verificar o potencial hemolítico do composto isolado selecionado;
- Avaliar se o composto isolado selecionado é citotóxico para células mononucleadas humanas provenientes de indivíduos clinicamente saudáveis;
- Avaliar a solubilidade e permeabilidade do composto isolado selecionado utilizando ferramentas computacionais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico que consiste em um equilíbrio entre proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes. Ela tem como objetivo manter a fluidez do sangue nos vasos sanguíneos, de modo a evitar possíveis hemorragias ou a formação de trombos indevidos (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; REIS *et al.*, 2003). O sistema hemostático é um mecanismo complexo que reconhece a lesão vascular, recruta uma combinação de componentes celulares e proteínas plasmáticas solúveis e produz um tampão insolúvel, que cessa o extravasamento sanguíneo. Os principais constituintes deste tampão incluem as plaquetas e a fibrina, que é formada a partir de uma proteína plasmática solúvel denominada fibrinogênio (COSTA *et al.*, 2010).

Didaticamente, a hemostasia é dividida em hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise. A hemostasia primária compreende a interação entre plaquetas e a parede dos vasos sanguíneos. Nessa etapa, após a lesão vascular e a exposição do endotélio, há ativação e adesão das plaquetas ao vaso lesionado e formação de um tampão hemostático com agregação plaquetária. A hemostasia secundária engloba os fatores teciduais que ativam a cascata da coagulação e resulta na formação de trombina (COSTA *et al.*, 2010; FAVALORO; LIPPI, 2018; VERSTEEG *et al.*, 2013). A fibrinólise representa a última fase da hemostasia, na qual há a degradação da fibrina e dissolução do coágulo formado, com restauração da circulação sanguínea local (FAVALORO; LIPPI, 2018; VERSTEEG *et al.*, 2013).

3.1.1 Hemostasia Primária

A hemostasia primária compreende a interação entre as plaquetas e a parede dos vasos sanguíneos. As plaquetas são fragmentos anucleados, de formato discoide, derivados do citoplasma de megacariócitos presentes na medula óssea. Elas têm sua produção regulada pela trombopoetina, e permanecem circulantes na corrente sanguínea por aproximadamente 7-10 dias. O sangue humano apresenta normalmente de 200.000 a 400.000 plaquetas/mm³. As plaquetas podem sintetizar um número limitado de proteínas, uma vez que elas contêm RNA mensageiro (RNAm), mas não um núcleo (COSTA *et al.*, 2010; THOMAS, M.R.; STOREY, R.F., 2015)

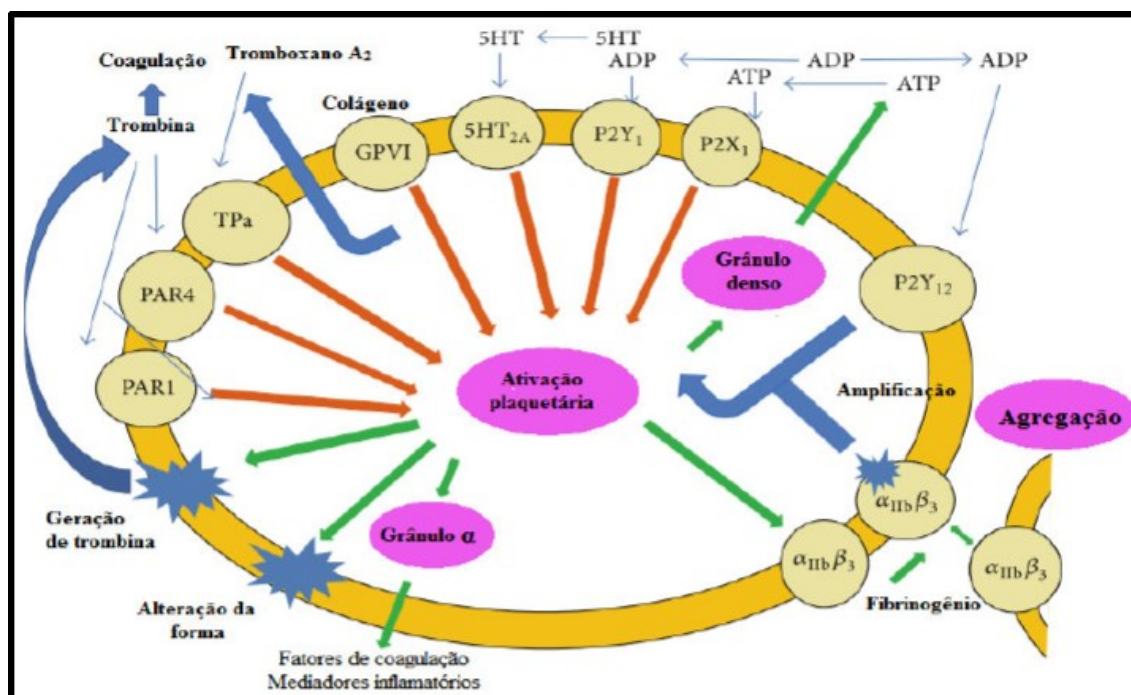
Em condições fisiológicas, as plaquetas não interagem com o endotélio vascular, pois este funciona como uma barreira que exerce ativamente funções antiaderentes e antiagregantes, principalmente através da liberação de prostaglandinas (PGI_2) e óxido nítrico (NO). Quando ocorre uma lesão vascular e consequente exposição de constituintes do subendotélio, como colágeno e fator de von Willebrand (FvW), as plaquetas iniciam o processo de adesão à parede do vaso, o que causa a sua ativação (COSTA *et al.*, 2010; PRYZDIAL *et al.*, 2018 VERSTEEG *et al.*, 2013).

A adesão plaquetária é mediada por diversas glicoproteínas (GP) de membrana, sendo o complexo GpIb/IX/V um dos principais responsáveis por esse processo. O principal componente desse complexo é a GpIb, que liga-se ao FvW que se encontra ligado ao colágeno exposto pelo subendotélio. As GpVI e GpIa/IIa são receptores de colágeno presentes na superfície das plaquetas e também promovem adesão, no entanto, diferentemente da GpIb, eles são capazes de se ligar diretamente ao colágeno exposto e não necessitam da presença de FvW (CIMMINO; GOLINO, 2013).

A ligação das GpIb, GpVI e GpIa/IIa aos seus ligantes desencadeia mecanismos de transdução de sinais que levam à conversão de fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), um fosfolípido presente na membrana das plaquetas, em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), e o IP_3 ativa canais de cálcio (Ca^{2+}) presentes na membrana do sistema tubular denso da plaqueta, proporcionando, então, a saída de íons Ca^{2+} desse e aumentando, consequentemente, a concentração de Ca^{2+} no citoplasma. O aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} promove a ativação da plaqueta, desencadeando três principais eventos: mudança conformacional da plaqueta, ativação do metabolismo do ácido araquidônico (AA) e secreção plaquetária (CHENG *et al.*, 2017; CIMMINO; GOLINO, 2013; COSTA *et al.*, 2010; PRYZDIAL *et al.*, 2018 VERSTEEG *et al.*, 2013).

O metabolismo do AA inicia-se com a ativação mediada pelo Ca^{2+} citosólico da fosfolipase A2, que gera AA através da clivagem de fosfolípidios de membrana. A enzima ciclo-oxigenase-1 (COX-1), presente nas plaquetas, converte AA em endoperóxidos cíclicos (prostaglandina G_2 - PGG_2 , e prostaglandina H_2 - PGH_2). A enzima tromboxano sintase converte estes endoperóxidos em TXA_2 . Estes produtos da COX-1 plaquetária (PGG_2 , PGH_2 e TXA_2) são potentes vasoconstritores e ativadores plaquetários (Figura 1) (CHENG *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2010).

Figura 1 - Mecanismos de ativação plaquetária.



GPVI – glicoproteína VI; ADP – difosfato de adenosina; ATP - trifosfato de adenosina; 5HT - serotonina.
Fonte: SOUZA (2016).

A mudança conformacional e emissão de pseudópodes se dá pela ativação do sistema contrátil actina-miosina (COSTA *et al.*, 2010; PRYZDIAL *et al.*, 2018; VERSTEEG *et al.*, 2013). A interação entre a miosina e a actina 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 quantidade significativa de moléculas bioativas, como ADP e serotonina (CIMMINO; GOLINO, 2013).

O TXA₂, o ADP, a serotonina, entre outros agonistas liberados pelas plaquetas ativadas irão se ligar aos seus receptores específicos ativando mais plaquetas no sítio da lesão e amplificando o sinal pró-agregante. Independentemente da via de ativação da plaqueta (adesão ou ligação de agonistas), a etapa final da hemostasia primária envolve a formação de um tampão plaquetário instável. Este evento é mediado pela ligação de proteínas adesivas, como o fibrinogênio, ao ligante receptivo do receptor GpIIb/IIIa. A forma receptiva de GpIIb/IIIa se liga a moléculas de fibrinogênio, que formam “pontes” entre as plaquetas, promovendo a agregação plaquetária e formação do tampão (CIMMINO; GOLINO, 2013).

3.1.2 Hemostasia Secundária

Simultaneamente à formação do tampão plaquetário, acontece a ativação da hemostasia secundária ou coagulação, que consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio (FI), em sua forma ativa, a fibrina (FIa), por ação de uma enzima denominada trombina. A coagulação sanguínea envolve uma ativação sequencial em cascata, na qual uma proteína plasmática inativa (zimogênio) é convertida em um produto ativo por meio da hidrólise de uma ou duas ligações peptídicas (COSTA *et al.*, 2010; VERSTEEG *et al.*, 2013).

Atualmente, o modelo de coagulação aceito é o baseado em superfícies celulares, sendo dividido em três fases: iniciação, amplificação e propagação (COSTA *et al.*, 2010). A fase de iniciação, classicamente denominada “via extrínseca da coagulação”, é impulsionada pela exposição do fator tecidual (FT) que se associa ao fator VII ativado (FVIIa) presente no sangue, formando o complexo FT-FVIIa que ativa os fatores IX e X (FIXa e FXa, respectivamente). O FXa formará um complexo com o fator V ativo (FVa) e será responsável por converter a protrombina (FII) em trombina (FIIa). O complexo FT-FVIIa apresenta uma meia-vida curta no plasma, sendo capaz de gerar apenas pequenas quantidades de trombina (COSTA *et al.*, 2010; FAVALORO; LIPPI, 2018). Dessa forma, para que ocorra a finalização do processo de formação do coágulo de fibrina, é necessário que ocorra a fase de amplificação.

Na fase de amplificação, a pequena quantidade de trombina que foi formada liga-se às plaquetas aderidas no local de lesão vascular e amplifica o sinal pró-agregante através da clivagem dos receptores do tipo PAR presentes na membrana das plaquetas (COSTA *et al.*, 2010; FAVALORO; LIPPI, 2018). A trombina também irá ativar o fator VIII (FVIIIa) ligado ao FvW e o fator XI (FXIa). Simultaneamente, se inicia a fase de propagação da coagulação. Nessa fase, o FXIa ativa o FIX (FIXa) que irá formar um complexo com o FVIIIa, os fosfolípidios e Ca^{2+} que estão aderidos à membrana plaquetária. Este complexo, por sua vez, ativará FX, o que culminará na produção de trombina em concentrações elevadas no sítio da lesão (CIMMINO; GOLINO, 2013; COSTA *et al.*, 2010). A trombina é a única enzima gerada no processo de coagulação capaz de converter o fibrinogênio em fibrina. Os monômeros de fibrina interagem entre si através de interações eletrostáticas formando uma rede insolúvel, porém instável, de fibrina. A consolidação deste polímero é feita pela ação do fator XIII ativado (FXIIIa), uma enzima que também é ativada pela trombina, a qual une covalentemente as

3.2 TROMBOSE

Quando algum dos mecanismos hemostáticos falha em decorrência de anormalidades genéticas ou adquiridas, pode ocorrer um evento hemorrágico ou complicações tromboembólicas (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; REIS *et al.*, 2003).

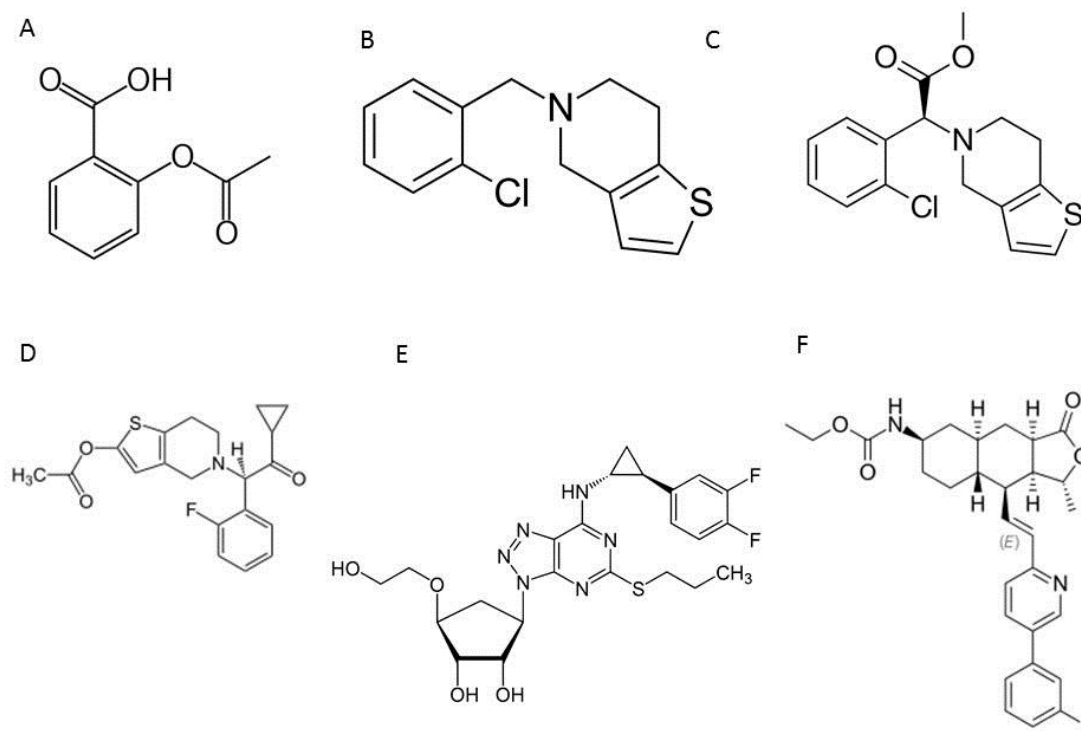
A trombose é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo. Ela pode ocorrer em veias ou artérias, e é a doença subjacente ao TEV, que inclui a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP), e a maioria dos casos de SCA e acidente vascular cerebral (AVC). Juntas, essas condições são responsáveis por 1 em cada 4 mortes em todo o mundo (FREDENBURGH; GROSS; WEITZ, 2017).

Os trombos são compostos de plaquetas agregadas, fibrina e células, mas a proporção desses componentes difere entre trombos arteriais e venosos. As plaquetas predominam nos trombos arteriais, que geralmente se formam sob condições de alta força de cisalhamento em locais de ruptura de placa aterosclerótica. Em contraste, a fibrina é o principal componente dos trombos venosos, que comumente se formam sob condições de baixa tensão de cisalhamento (FREDENBURGH; GROSS; WEITZ, 2017). Tradicionalmente, essas características distintivas influenciam a escolha da terapia antitrombótica. Fármacos antiplaquetários são a base para a prevenção e tratamento da trombose arterial, enquanto anticoagulantes têm sido a base para o gerenciamento de TEV (FAVALORO; LIPPI, 2018; FEITOSA-FILHO *et al.*, 2019; FREDENBURGH; GROSS; WEITZ, 2017).

3.3 TERAPIAS PREVENTIVAS E DE TRATAMENTO PARA TROMBOSE

Devido à prevalência de doenças cardiovasculares provenientes de complicações tromboembólicas, a utilização de medicamentos que auxiliem na prevenção e tratamento dessas doenças tem aumentado nos últimos anos (Figura 3) (PEREIRA *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2003).

Figura 3 - Estruturas químicas dos antiplaquetários.



A – Ácido acetilsalicílico; B – Ticlopidina; C – Clopidogrel; D – Prasugrel; E – Ticagrelor; F – Voraxapar. Fonte: elaboração própria.

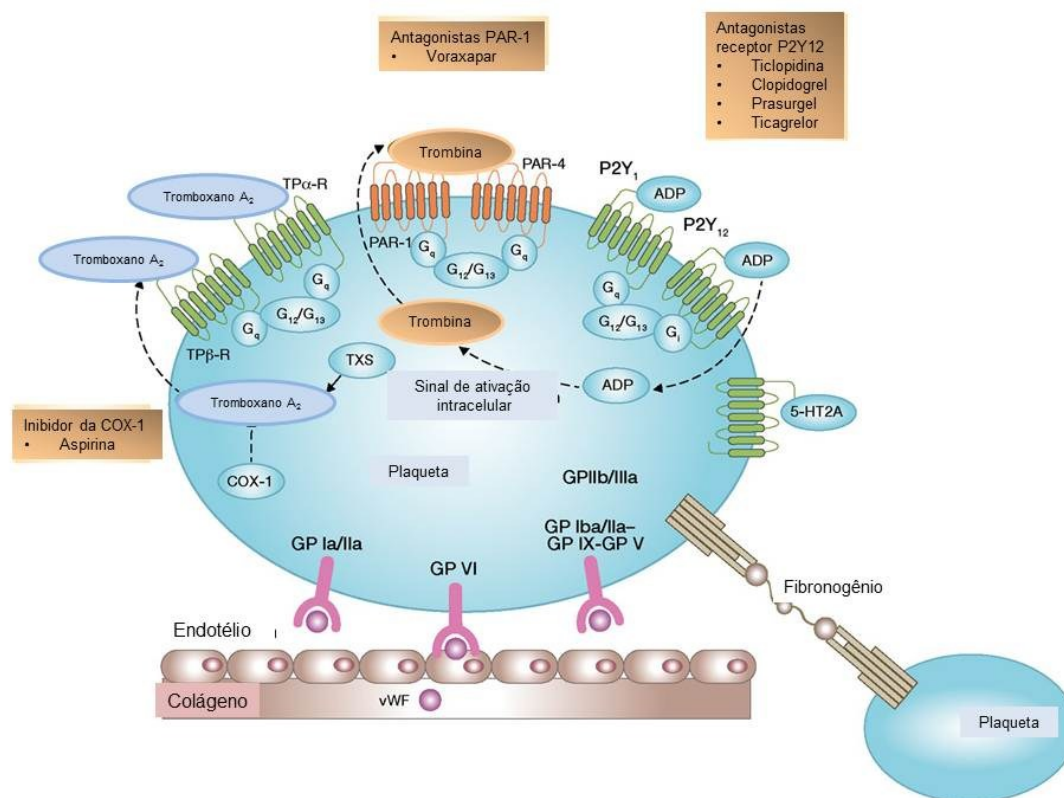
O AAS é o antiagregante plaquetário mais utilizado e continua sendo o padrão ouro da terapia antiplaquetária. Ele atua acetilando irreversivelmente a COX-1 e, conseqüentemente, inibindo a síntese de TXA₂ a partir do ácido araquidônico. Os efeitos antiplaquetários ocorrem rapidamente e leva de 3 a 4 dias para a completa recuperação da agregação plaquetária após a interrupção do tratamento. Uma baixa dose de manutenção é preferida, pois doses mais altas são geralmente associadas com o aumento do risco de sangramento sem melhora nos resultados isquêmicos. Como o AAS não pode impedir a ativação plaquetária por outras vias, a terapia combinada a outro agente antiplaquetário oral é geralmente recomendada. De fato, o uso combinado de AAS e inibidores do receptor plaquetário de ADP, o P2Y₁₂, apresentou inibição aditiva da ativação plaquetária (BERGER, 2018).

A ticlopidina e o clopidogrel representam a primeira e segunda geração de inibidores do receptor P2Y₁₂, respectivamente, e ambos pertencem à classe das tienopiridinas, que previne seletiva e irreversivelmente a ligação do ADP ao receptor P2Y₁₂. Embora eficaz como antiplaquetário, o uso de ticlopidina está associado a

efeitos adversos potencialmente graves, como a supressão da medula óssea. Por este motivo, o clopidogrel é o inibidor P2Y12 atualmente mais utilizado. O clopidogrel é um pró-fármaco que requer a conversão hepática pelas enzimas do citocromo P450 para produzir um metabólito ativo. Ele é amplamente utilizado na prevenção de eventos isquêmicos e estudos tem demonstrado que o clopidogrel é mais efetivo que o AAS na redução de riscos de infarto do miocárdio isquêmico, AVC e morte vascular (BERGER, 2015; McEWEN, 2015).

Como o clopidogrel, o prasurgel é uma tienopiridina e, portanto, bloqueia a ligação do ADP ao receptor P2Y12 irreversivelmente. Ele é também um pró-fármaco, requerendo ativação metabólica hepática, porém tem um início de ação mais rápido que o clopidogrel. O ticagrelor é o primeiro de uma nova classe de agentes chamados ciclo-pentiltriazolopirimidinas que inibe reversivelmente o receptor P2Y12 ligando-se a um sítio diferente. Esse fármaco não bloqueia a ligação do ADP, mas inibe a ativação plaquetária bloqueando a transdução de sinal induzida pelo ADP. Ao contrário do prasurgel, o ticagrelor é um fármaco de ação direta com um início de ação mais rápido que o clopidogrel. O voraxapar é um novo antagonista oral de PAR-1 que inibe a ativação de plaquetas mediada por trombina, que é independente da via mediada por ADP e TXA2 (Figura 4) (BERGER, 2015).

Figura 4 - Alvos celulares para fármacos antiplaquetários.



ADP – Difosfato de adenosina; COX -1 – Ciclooxigenase 1; GP – Glicoproteína; 5-HT – Serotonina; PAR – Receptor de proteína ativada. Adaptado de: BERGER (2018).

As terapias que envolvem a utilização de AAS e/ou clopidogrel possuem uma limitação de eficácia, que é a possibilidade de ocorrência de resistência a esses fármacos. Essas resistências são descritas na literatura como clínica e/ou laboratorial. A resistência clínica na maioria das vezes resulta em reincidência de eventos trombóticos mesmo com a administração correta do medicamento. A resistência laboratorial possui uma definição mais complexa, e é interpretada como a incapacidade do indivíduo de inibir a função plaquetária, medida por testes padrão para hemostasia de plaquetas. A prevalência de resistência aos antiagregantes plaquetários varia amplamente e depende da população estudada. Em pacientes com doença coronariana aguda e distúrbios metabólicos concomitantes (dislipidemia, diabetes, obesidade, hipertensão, etc) a resistência ao AAS tem sido definida em 5 a 60% dos pacientes, já os que apresentam resistência ao uso do clopidogrel representam de 5 a 30% dos pacientes (JASTRZEBSKA *et al.*, 2018). Os fármacos mais recentes na classe dos antiplaquetários (prasurgel, ticagrelor e voraxapar), também possuem limitações e efeitos adversos a serem considerados. Prasurgel e ticagrelor possuem um risco

aumentado de hemorragia intracraniana (incluindo hemorragia fatal no caso do prasugrel) e o ticagrelor está associado a um aumento do risco de dispnéia. Estudos de fase III relataram que o voraxapar aumentou a taxa de sangramento intracraniano. Por isso, possui como contraindicação seu uso em pacientes com histórico de AVC, hemorragia intracraniana ou sangramento patológico ativo (BERGER, 2018).

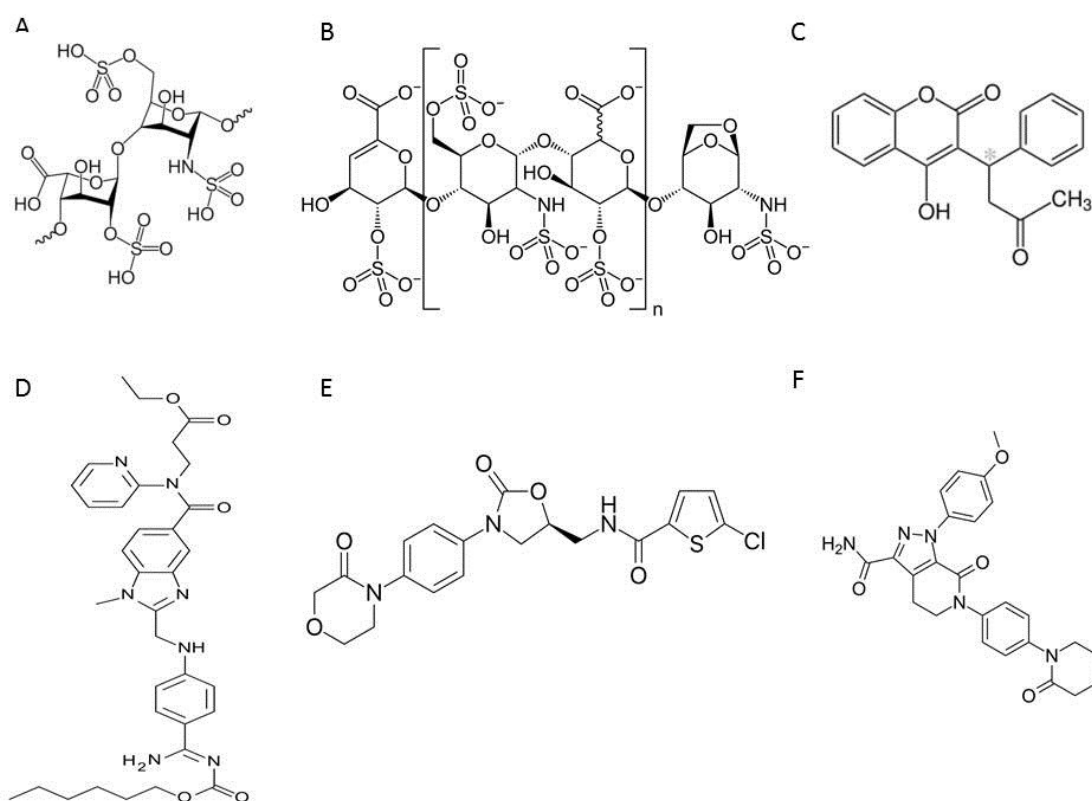
Na classe dos anticoagulantes, a heparina foi o primeiro anticoagulante utilizado clinicamente e continua sendo o mais usado, embora a única via de administração seja a parenteral (devido a suas cargas altamente negativas e alto peso molecular), o que dificulta a adesão ao tratamento (CARVALHAL *et al.*, 2019). A heparina é um glicosaminoglicano altamente sulfatado e é extraída e purificada de tecidos animais, incluindo intestino de porco, e pulmão e intestino bovino. As HBPM são produzidas através da despolimerização controlada da heparina (ONISHI *et al.*, 2016). As HBPM, também atuam como anticoagulantes, porém com biodisponibilidade adequada por via subcutânea, dose-resposta mais previsível e menos efeitos adversos. Dentre as HBPM, a enoxaparina é a mais utilizada atualmente (VILANOVA *et al.*, 2016). De modo geral, as heparinas atuam inibindo principalmente a trombina (FIIa) e/ou o FXa. Como é possível prever, os principais efeitos adversos relacionados ao uso das heparinas são hemorragias, porém também são relatados trombocitopenia induzida por heparina e osteoporose. Sua utilização é contraindicada em pacientes renais, visto que a principal via de eliminação é a renal (ONISHI *et al.*, 2016).

A varfarina é um AVK e tem sido usada há décadas para tratar pacientes com FA, trombose, EP e portadores de válvulas cardíacas protéticas. Ela atua tratando e prevenindo a formação de coágulos sanguíneos ao diminuir a produção de fatores de coagulação dependentes de vitamina K (FII, FVII, FIX e FX) (McEWEN, 2015). Embora a varfarina seja um fármaco de baixo custo, está associada a muitos efeitos adversos, o que dificulta sua utilização. Ela é frequentemente associada a sangramentos, apresentando uma taxa de cerca de 7,2 eventos por 100 pacientes/ano. Ainda é importante relatar que ela possui uma janela terapêutica estreita, exige monitoramento frequente e apresenta muitas interações com alimentos e medicamentos. De fato, a varfarina está entre os três principais fármacos responsáveis por internações hospitalares relacionadas à reação adversa a medicamentos (PETERSON *et al.*, 2019; PIRMOHAMED, 2018).

O desenvolvimento dos DOACs para o tratamento da doença tromboembólica foi considerado um avanço tecnológico. Durante a última década, eles foram

gradualmente substituindo os AVK, que eram a única classe disponível de anticoagulantes orais por quase seis décadas. Os DOACs atuam por inibição direta da trombina (dabigatrana) ou do FXa (rivaroxabana, apixabano e edoxaban) (Figura 5). Eles são tão eficazes como a varfarina para profilaxia em pacientes com FA e para prevenção e tratamento de TEV, e está associada com um risco mais baixo de hemorragias. Embora o risco de hemorragia seja menor, quando ocorre, no geral é mais grave. Em comparação com AVK, os DOACs tem um efeito terapêutico mais previsível, não requerem monitoramento do efeito anticoagulante, tem menos interações com outros fármacos e não requerem restrição de alimentos contendo vitamina K. Uma das principais limitações desde a introdução dessa nova classe de anticoagulantes tem sido a ausência de agentes específicos para reverter seu efeito em caso de hemorragia grave ou necessidade de cirurgia de emergência (ENRIQUEZ, BARANCHUK, CORBALÁN, 2019).

Figura 3 - Estruturas químicas dos anticoagulantes.



A – Heparina; B – Enoxaparina; C – Varfarina; D – Dabigatrana; E – Rivaroxabana; F – Apixabano.
Fonte: elaboração própria.

3.4 COMPOSTOS NATURAIS

As plantas são usadas há milhares de anos por seus benefícios nutricionais e médicos. O conhecimento de seu uso é dinâmico, passado de geração em geração, e as tradições de diferentes regiões, culturas e famílias afetam o seu uso. Plantas medicinais são importantes para o tratamento e prevenção de doenças, mas precisam ser utilizadas com segurança. Na medicina tradicional, não são usadas apenas em pequena escala, mas também tem importante valor industrial e comercial. As plantas medicinais também são uma fonte inesgotável de materiais terapêuticos, como fitoterápicos, fitofarmacêuticos, fármacos semi-sintéticos e protótipos de fármacos sintéticos. Os compostos naturais possuem estruturas complexas e são farmacologicamente ativos em organismos vivos, auxiliando assim na farmacoterapia. Muitos fármacos comercializados atualmente são provenientes de compostos extraídos das plantas, com alguns exemplos incluindo os salicilatos/AAS (da casca do salgueiro), digoxina (da dedaleira), quinina (da casca da cinchona), morfina (da papoula do ópio) e a varfarina (dicumarol) (LEITE, MARTINS, CASTILHO, 2016; McEWEN, 2015).

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que compostos naturais, incluindo os de origem marinha, têm potencial biotecnológico na indústria e na medicina, apresentando variadas atividades, como antiplaquetária (BADIMON, VILAHUR, 2013), anticoagulante (MOURA *et al.*, 2011), citotóxica (ALVES *et al.*, 2018), antiparasitária (GARCIA-DAVIS *et al.* 2018), entre outras. 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 (COSTA *et al.*, 2010). As algas marinhas são os recursos mais abundantes no oceano e possivelmente contém uma rica fonte de metabólitos funcionais como polissacarídeos, proteínas, peptídeos, lipídios, aminoácidos, polifenóis e sais minerais.

As algas marinhas podem ser classificadas em três grandes grupos com base na sua pigmentação e composição química: algas castanhas (Phaeophyceae), algas vermelhas (Rhodophyceae) e algas verdes (chlorophyceae). Nos últimos anos, numerosos polissacaderídeos isolados de algas marinhas atraíram grande interesse em alimentos funcionais, produtos farmacêuticos e aplicações cosméticas. Os polissacarídeos são um tipo de biomacromolécula que existem como componentes

estruturais da parede celular das algas. Eles estão frequentemente ligados a atividades farmacológicas como anticoagulantes, antioxidante, antitumoral e imunomodulatório (CAMARA *et al.*, 2011; XU, HUANG, CHEONG, 2017).

No contexto da hemostasia, trabalhos já demonstraram que um grande número de compostos isolados de algas possui atividade antitrombótica. Nesse sentido, a busca por novos medicamentos antitrombóticos se faz necessária e os produtos marinhos podem representar uma fonte importante para a pesquisa de novas terapias (MOURA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2017).

4 METODOLOGIA

4.1 PRINCIPAIS REAGENTES E EQUIPAMENTOS

A avaliação dos ensaios de coagulação sanguínea foi realizada em coagulômetro semiautomatizado (CLOTimer, Quick Timer) e os TPs e TTPas através do uso de conjuntos diagnóstico da marca CLOT[®] (BIOS Diagnóstica, Brasil). Para análise da agregação plaquetária, os ensaios foram realizados em agregômetro semiautomatizado (Agrego – Qualitem) e os agonistas utilizados para a estimulação foram: ADP (6 μ M; Sigma-Aldrich[®], EUA); epinefrina (6 μ M; Hipolabor, Brasil); AA (500 μ M; Chrono-Log Corp., EUA) e colágeno (2 μ g/mL; Chrono-Log Corp., EUA). O teste de hemólise foi realizado com o auxílio do espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika[®]). Nos ensaios de citotoxicidade utilizou-se MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio; Amresco[®], EUA), Ficoll-Hypaque (densidade 1,077g/m³, Sigma-Aldrich[®], EUA) e meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco[®], Irlanda) 1640. Para avaliação da viabilidade plaquetária, utilizou-se o corante Azul de Trypan 0,04% (Sigma-Aldrich[®], EUA) e o reagente *FIX and PERM*[®] (BD Biosciences, EUA). Nos ensaios de citometria de fluxo, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC (clone PAC-1; BD Biosciences, EUA), anti-CD62P-PE (clone AK-4; BD Biosciences, EUA) e anti-CD61-PerCP (clone PN IM 1758U; BD Biosciences, EUA). Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) 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). Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados no software Infinicyt (Cytognos[®], Espanha) versão 1.7. A predição teórica de solubilidade e permeabilidade foi determinada utilizando-se o programa *freeware Free molinspiration* disponibilizado *online*, através do JME Editor, cortesia de Peter Ertl da Novartis, disponível no *site*: <http://www.molinspiration.com/cgibin/properties>.

4.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES E COLETA DAS AMOSTRAS

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).

As amostras de sangue utilizadas nos experimentos foram obtidas 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/EBSERH). Os participantes foram esclarecidos sobre os objetivos, riscos e benefícios de participar da pesquisa e, após a concordância com o desenvolvimento do estudo, solicitou-se a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a amostra de sangue foi coletada. Para os ensaios de coagulação sanguínea, de agregação plaquetária, de viabilidade plaquetária e de citometria de fluxo foram utilizadas amostras anticoaguladas com citrato de sódio 0,38%. Para os testes de potencial de hemólise e de citotoxicidade em células mononucleares foram utilizadas amostras de sangue venoso anticoaguladas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para cada experimento foram utilizadas amostras de pelo menos três doadores.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E COMPOSTOS ISOLADOS

Os extratos brutos e compostos isolados foram obtidos e gentilmente cedidos pelas doutorandas do Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (PPGFAR-UFSC) Ana Cláudia Philippus e Gabriele Andressa Zatelli, que são orientadas pela Professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg do Laboratório de Investigação de Produtos Naturais Marinhos da UFSC.

4.3.1 Extratos brutos

No presente trabalho, foi avaliado o efeito de 27 extratos brutos de algas marinhas pardas sobre a hemostasia. Os extratos foram obtidos a partir de algas marinhas pardas de diversas espécies e de vários locais de coleta no Brasil e exterior (Tabela 1). Os extratos AP27, AP47 e AP39 não estão listados na Tabela 1, pois foram obtidos a partir de espécies de algas pardas ainda não identificadas. Todos os extratos

brutos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração estoque entre 120 e 160 mg/mL e armazenados a temperatura de 2-8 °C . Para realização dos ensaios, a solução estoque foi diluída em tampão fosfato-salino (PBS – pH 7,4) de modo que as concentrações finais ficassem entre 600 e 800 µg/mL.

Tabela 1 - Dados sobre coleta e identificação das espécies de algas marinhas.

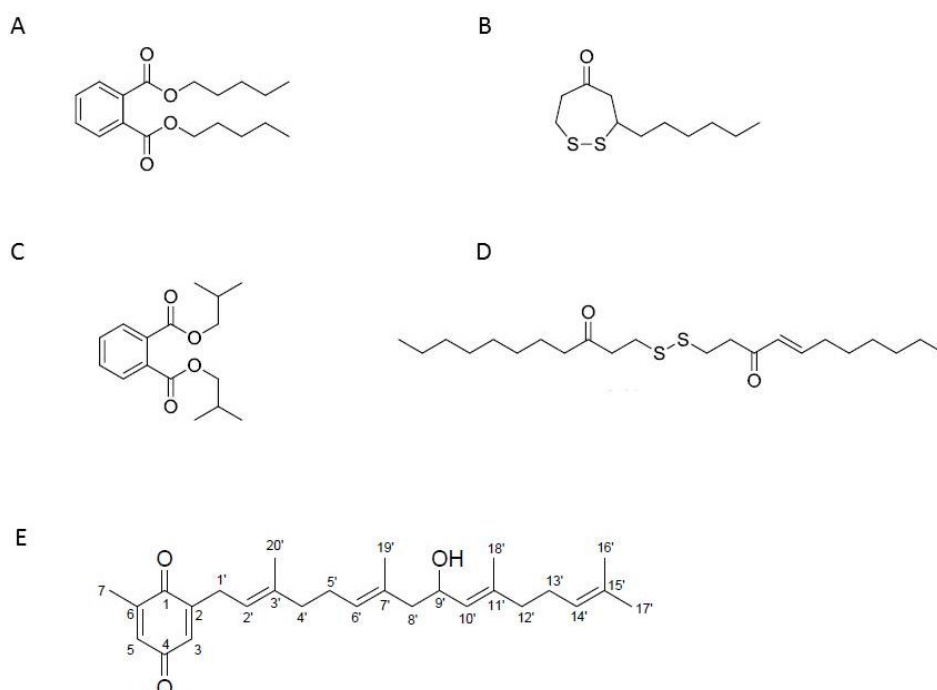
Espécie	Local de Coleta	Data da Coleta	Código
<i>Desmarestia menziesii</i> J. Agardh	Demay – Antártida	21/01/2016	ADM
	Punta Plaza – Antártida	07/12/2015	ADMPP
	Half Moon – Antártida	04/12/2013	ADMHM
	Ilha do Elefante – Antártida	13/12/2014	ADMIE
<i>Desmarestia anceps</i> Montagne	Ilha Nelson – Antártida	23/01/2016	ADA
<i>Gigartina skottsbergii</i> Setchell & N.L. Gardner	Greenwich – Antártida	23/01/2016	AGS
<i>Iridaea cordata</i> (Turner) Bory de Saint-Vincent	Demay – Antártida	21/01/2016	AIC
<i>Ascoseira mirabilis</i> Skottsberg	Ilha Nelson – Antártida	21/01/2016	AAM
<i>Palmaria decipiens</i> (Reinsch) R.W. Ricker	Demay – Antártida	21/01/2016	APD
<i>Dictyopteris jolyana</i>	Arquipélago de Fernando de Noronha	01/2015	DJ2
	Arquipélago de Fernando de Noronha (Laje Dois Irmãos)	08/2013	DJ4
	Arquipélago de Fernando de Noronha (Porto)	08/2013	DJ5
	Arquipélago de São Pedro e São Paulo (Enseada) (1-5 m)	10/2015	DJ6
	Cabo Branco - Paraíba	07/2011	DJ7
	Cabo Branco - Paraíba	07/2011	DJ8
	Maragogi - Alagoas	03/2012	DJ9
	Arquipélago de Fernando de Noronha (Praia do Sudeste)	10/2016	DJ10
	<i>Dictyopteris plagiogramma</i>	Arquipélago de Fernando de Noronha (Cabras) (12 m)	11/2014
Arquipélago de Fernando de Noronha (Costão direito da Praia da Conceição/Ponta do Meio) (0-5 m)		10/2015	DP6
Atol das Rocas (Piscinas Cemitério e Farol 2)		05/2016	DP7
Arquipélago de Fernando de Noronha (Baía do Sueste)		10/2016	DP8
<i>Dictyopteris delicatula</i>		Arquipélago de Fernando de Noronha	01/2015
	Arraial D' Ajuda - Bahia	04/2015	DD3
<i>Dictyopteris justii</i>	Arquipélago de Fernando de Noronha (Cabras)	11/2014	DI1

Dados cedidos por: PHILLIPUS; ZATELLI (2018).

4.3.2 Compostos isolados

Com base nos resultados da triagem dos extratos brutos, foram selecionados quatro compostos isolados a partir do extrato bruto de *Dictyopteris jolyana*, dois ftalatos (DJ12 e DJ14) e dois dissulfetos (DJ13 e DJ17), e uma plastoquinona (AP1) isolada de *Desmarestia menziesii* para terem sua atividade sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea avaliada. Os compostos isolados foram solubilizados em DMSO na concentração estoque de 100 mM e armazenados a temperatura de 2-8 °C. Para realização dos experimentos, os compostos foram diluídos a partir da solução estoque com PBS (pH 7,4) no mesmo dia do experimento. Conforme o ensaio realizado, a concentração final dos compostos isolados variou de 500 µM a 15,6 µM. Na Figura 6, observam-se as estruturas químicas dos compostos isolados testados.

Figura 4 - Estrutura química proposta dos compostos isolados.



Painel A - DJ12 (ftalato), Painel B - DJ13 (dissulfeto), Painel C - DJ14 (ftalato), Painel D - DJ17 (dissulfeto), e Painel E - AP1 (plastoquinona). Dados cedidos por: ZATELLI; PHILLIPUS (2018).

4.4 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUINEA

Os experimentos de coagulação sanguínea foram realizados de acordo com Triplett, Harms e Koepke (1978) utilizando-se coagulômetro semiautomatizado. Para os

ensaios de coagulação, foi utilizado um *pool* de plasma pobre em plaquetas (PPP) obtido a partir de sangue citratado centrifugado a 1.107 g por 15 minutos a 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 experimentos, 100 µL do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL dos extratos brutos, compostos isolados ou DMSO 0,7% (controle). Em seguida, foram realizados os testes de TP ou TTPa, conforme bula do conjunto diagnóstico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em até três horas após a coleta da amostra.

4.5 ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados de acordo com Born e Cross (1963), utilizando-se um agregômetro semi-automatizado. Para obtenção do *pool* de plasma rico em plaquetas (PRP), as amostras de sangue anticoaguladas foram centrifugadas a 123 g por 10 minutos à temperatura ambiente e todos os PRP foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Em seguida, as plaquetas foram enumeradas em câmara de Neubauer e ajustadas com PBS para 250.000 plaquetas/mm³. Para analisar o efeito dos extratos brutos e dos compostos isolados, 400 µL do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL de extrato bruto, composto isolado ou DMSO 0,6% (controle). Após a incubação, o PRP foi estimulado com ADP ou epinefrina, e a agregação foi acompanhada por 5 minutos. O composto isolado que apresentou melhor atividade antiagregante também teve seu efeito avaliado utilizando-se AA e colágeno como agonistas. Para ajustar a base de turbidez da amostra, foi utilizado o *pool* de PPP obtido pela centrifugação das amostras de sangue citratado.

Para determinar a CI_{50} do composto com melhor atividade antiagregante, o composto foi utilizado em concentrações que variaram entre 500 µM e 15,6 µM. Após realizar as diluições, o PRP foi incubado com o composto isolado nas várias concentrações ou com o veículo de dissolução (controle). A porcentagem de agregação foi determinada conforme descrito acima. A CI_{50} foi determinada a partir da curva dose-resposta gerada no software GraphPad Prism 5. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em até três horas após a coleta da amostra.

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE PLAQUETÁRIA

A avaliação do efeito do composto com melhor atividade antiagregante sobre a viabilidade plaquetária foi realizada utilizando-se o método de exclusão com corante Azul de Trypan (LOPEZ *et al.*, 2015). Esse método é muito utilizado para avaliar a citotoxicidade em investigações experimentais onde as células viáveis possuem suas membranas celulares intactas e o azul de trypan não é capaz de penetrar, ao contrário das células lesionadas ou mortas que absorvem o azul de trypan em seu citoplasma devido a perda da seletividade na membrana, tornando-as azuladas (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2014).

Inicialmente, foi preparado um *pool* de PRP conforme já descrito no item 4.5. Após a obtenção do *pool* de PRP, 400 µL da amostra foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL de composto isolado (500 µM) ou DMSO 0,6% (controle negativo). Para o controle positivo de morte celular, utilizaram-se os reagentes *FIX & PERM*[®]. Simplificadamente, 100 µL de PRP foram incubados por 15 minutos com 100 µL do reagente FIX-A. Após esse período, a solução foi lavada com 1 mL de PBS (pH 7,4) e centrifugada a 264 g por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, adicionou-se 100 µL de reagente FIX-B e a mistura foi incubada por mais 15 minutos. Após, o PRP foi novamente lavado com PBS (pH 7,4) e o *pellet* de plaquetas foi suspenso em 100 µL de PBS (pH 7,4).

Após as incubações do PRP com o composto ou controles, 100 µL de PRP tratado foi misturado a 100 µL de Azul de Trypan 0,04%. Em seguida, as plaquetas viáveis (translúcidas) e não viáveis (azuis) foram contadas em câmara de Neubauer, em aumento de 40 vezes em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200[®]). A porcentagem de células viáveis foi calculada segundo a Equação 1. No controle negativo, a porcentagem de células viáveis deve ser de pelo menos 95%. Já no controle positivo, espera-se que as células viáveis não ultrapassem 5%. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de plaquetas viáveis.

$$\% \text{ de plaquetas viáveis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de plaquetas viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ total de plaquetas}} \times 100$$

Fonte: autora.

4.7 EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P SELECTINA

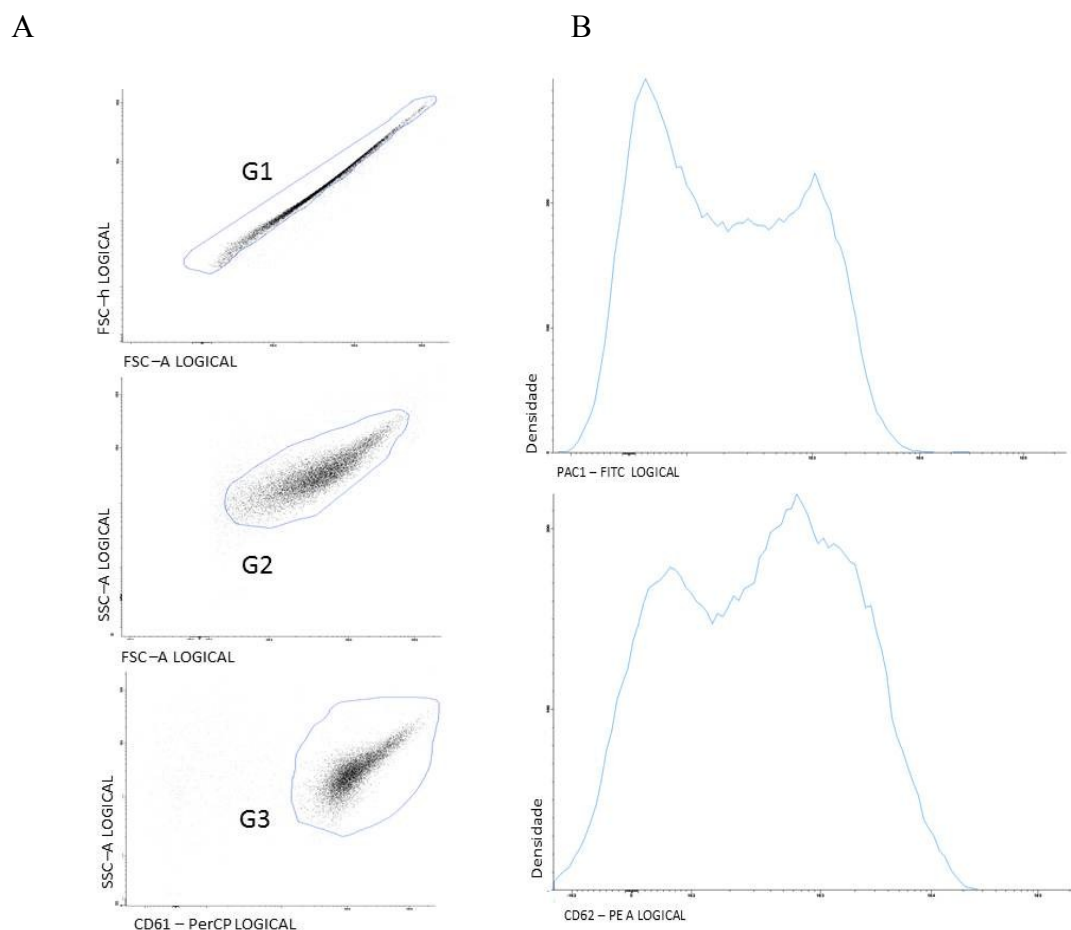
A inibição da ativação plaquetária após a adição do composto com melhor atividade antiagregante foi avaliada pela metodologia de citometria de fluxo através da determinação da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado e de P selectina, utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC e anti-CD62P-PE, respectivamente. A P-selectina está localizada na membrana dos grânulos- α plaquetários e, após a ativação da plaqueta e consequente secreção desses grânulos, a P-selectina passa a ser também expressa na membrana plaquetária. Os anticorpos do tipo PAC1 reconhecem especificamente a conformação ativada do complexo GpIIb/IIIa, que está presente na membrana apenas de plaquetas ativas (LANDI; MARQUES JÚNIOR, 2003). Adicionalmente aos anticorpos já mencionados, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-CD61-PerCP, que se liga à forma inativa e ativa da GpIIIa das plaquetas e auxilia a identificação dessas no momento da aquisição e análise dos dados.

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 do composto isolado (500 μ M) ou de DMSO 0,6 (controle). Após a incubação, as amostras foram estimuladas com ADP 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, 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. Paralelamente ao processo de marcação das plaquetas estimuladas, foi realizada a marcação de um tubo controle, para avaliar autoativação, em que o PRP não estimulado com o agonista foi marcado com todos os anticorpos monoclonais. Em cada tubo foram avaliados 10.000 eventos positivos para CD61.

A intensidade de fluorescência média (IFM) dos marcadores foi analisada pela ferramenta de fusão de arquivos do software de análise Infinicyt. Brevemente, 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. Dessa forma, ao final, tem-se um arquivo contendo as informações de um grupo de experimentos que permite a visualização e análise simultânea das plaquetas de todos os experimentos.

Para determinação da IFM de PAC1 e CD62PE, identificou-se as plaquetas por meio de suas características de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente), bem como pelas suas expressão forte de CD61 (Figura 7).

Figura 5 - Estratégia de 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 das propriedades 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: autora

Os resultados dos ensaios de citometria de fluxo foram representados como porcentagem de inibição segundo a Equação 2 (BIRIS *et al.*, 2003). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Equação 2 - Cálculo da porcentagem de inibição a partir da intensidade de fluorescência média (IFM).

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

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

4.8 ENSAIOS DE POTENCIAL HEMÓLÍTICO

Para avaliar o potencial hemolítico do composto com melhor efeito antiagregante, foi realizado o teste de hemólise (WANG *et al.*, 2009). As amostras de sangue total foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado, obtendo-se uma papa de hemácias. As hemácias foram “lavadas” duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,9%). Após a última lavagem, foi preparada uma suspensão estoque de eritrócitos com solução salina, de modo que os valores de absorbância ficassem entre 1,8 e 2,2 quando realizada a leitura em espectrofotômetro em 540 nm.

Em um microtubo de fundo cônico, misturou-se 50 µL de suspensão estoque de hemácias, 950 µL de solução salina e o composto isolado nas concentrações de 239,7 µM (CI₅₀ mais alta), 479,4 µM (2x CI₅₀ mais alta) e 719,1 µM (3x CI₅₀ mais alta). O controle positivo de 100% de hemólise foi obtido ao misturar-se 50 µL de suspensão estoque de hemácias e 950 µL de água destilada. Para o controle de 0% de hemólise (controle negativo), misturou-se 50 µL de suspensão estoque de hemácias, 950 µL de solução salina e DMSO (0,6% concentração final). Cada microtubo foi incubado a 37 °C por uma hora sob agitação de 100 g. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 500 g por 5 minutos, e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (540 nm). A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a Equação 3. Uma taxa de hemólise entre 0 e 2% foi considerada não hemolítica, entre 2 e 5%, levemente hemolítica e maior que 5%, hemolítica (BAUER *et al.* 2012). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Equação 3 - 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: autora.

4.9 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS SANGUÍNEAS HUMANAS

Para avaliar se o composto isolado selecionado era citotóxico para células mononucleadas humanas, utilizou-se o método do MTT (MOSMANN, 1983). As células mononucleares sanguíneas foram separadas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque (densidade 1,077g/m³). Após a separação, as células foram “lavadas” duas vezes com tampão PBS e posteriormente ressuspensas em meio cultura celular RPMI 1640 para avaliação do número de células viáveis 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 x 10⁵ células/200 µL de meio a cada poço da placa de cultura celular de 96 poços e, em seguida, as células mononucleares foram incubadas por 24 horas com o composto isolado (500 µM) ou com DMSO 0,6% (controle) a 37 °C e 5% de CO₂. Ao fim da incubação, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e adicionou-se novo meio de cultura contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS – pH 7,4). Depois de três horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados nos poços foram dissolvidos em solução ácida de isopropanol e em seguida foi realizada a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro (540 nm). Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem de células viáveis, para tanto, a densidade óptica do grupo controle foi considerada como 100% de células viáveis. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL

O composto isolado selecionado foi avaliado quanto aos parâmetros físico-químicos, com o intuito de prever teoricamente suas características de permeabilidade e solubilidade nas membranas biológicas. Para isso, foi utilizada a plataforma Molinspiration e os parâmetros avaliados foram massa molecular (MM), número de grupamentos aceptores de ligação de hidrogênio (nON), número de grupamentos doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH) e coeficiente de partição octanol-água (miLogP). Esses dados fazem parte da regra dos cinco de Lipinski, cujos valores são múltiplos do número cinco. Outras propriedades que não compõem a regra dos cinco também são calculadas pelo programa, como número de ligações rotacionáveis (N rotb), área de superfície polar topológica (TPSA) e volume. A análise dos dados foi realizada considerando as regras de Lipinski e Veber (LIPINSKI *et al.*, 2001; VEBER *et al.*, 2002).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software MedCalc[®] v.18.9 e para a confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0[®]. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. 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 Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 95% ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS DE ALGAS MARINHAS SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina após o tratamento do PRP com os extratos brutos de algas. Como se pode observar, 15 extratos inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP e/ou epinefrina.

Tabela 2 - Efeito inibitório dos extratos brutos de algas sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 6 μ M) e epinefrina (6 μ M).

Tratamento	ADP Média \pm DP (%)	Epinefrina Média \pm DP (%)
Controle (DMSO 0,6%)	93,8 \pm 2,9	92,8 \pm 0,4
ADM (800 μg/mL)	86,9 \pm 7,7	58,7 \pm 9,6*
ADMPP (800 μg/mL)	84,5 \pm 3,5	54,3 \pm 5,5*
ADMHM (800 μg/mL)	85,1 \pm 10,5	58,7 \pm 5,9*
ADMIE (800 μg/mL)	84,4 \pm 7,5	69,3 \pm 5,0
ADA (800 μg/mL)	69,5 \pm 0,7*	68,0 \pm 5,0
AGS (800 μg/mL)	78,7 \pm 8,1	47,0 \pm 13,8*
AIC (800 μg/mL)	68,1 \pm 6,2*	48,7 \pm 12,8*
AAM (800 μg/mL)	60,0 \pm 2,6*	51,2 \pm 12,1*
APD (800 μg/mL)	72,3 \pm 10,0	62,7 \pm 2,9*
AP27 (800 μg/mL)	80,0 \pm 3,7	51,2 \pm 7,0*
AP47 (800 μg/mL)	90,7 \pm 8,5	82,7 \pm 5,0
AP49 (800 μg/mL)	87,0 \pm 10,4	67,7 \pm 3,5
DJ2 (600 μg/mL)	73,7 \pm 3,1	96,3 \pm 3,1
DJ4 (600 μg/mL)	77,0 \pm 5,3	90,5 \pm 7,0
DJ5 (600 μg/mL)	93,3 \pm 7,2	92,0 \pm 4,2
DJ6 (600 μg/mL)	71,7 \pm 5,0	72,5 \pm 4,8
DJ7 (600 μg/mL)	79,3 \pm 3,2	94,0 \pm 2,0
DJ8 (600 μg/mL)	89,0 \pm 8,2	93,3 \pm 4,9
DJ9 (600 μg/mL)	91,3 \pm 5,9	90,5 \pm 4,0
DJ10 (600 μg/mL)	56,3 \pm 2,2*	57,8 \pm 6,6*
DP2-4 (600 μg/mL)	93,3 \pm 2,5	75,5 \pm 7,8
DP6 (600 μg/mL)	41,0 \pm 7,8*	31,5 \pm 2,1*
DP7 (600 μg/mL)	39,3 \pm 2,1*	88,7 \pm 8,7
DP8 (600 μg/mL)	50,3 \pm 17,9*	91,5 \pm 0,7
DD2 (600 μg/mL)	56,3 \pm 1,2*	55,0 \pm 5,9*
DD3 (600 μg/mL)	97,0 \pm 0,0	73,5 \pm 11,8
DI1 (600 μg/mL)	67,7 \pm 6,8*	93,3 \pm 3,1

DP – desvio padrão; DMSO – dimetilsulfóxido. (N = 3) *Diferença significativa em relação ao controle (P \leq 0,05). Fonte: elaboração própria.

Além do efeito sobre a agregação plaquetária, também foi avaliado o efeito dos extratos brutos de algas sobre TP e TTPa (Tabela 3). Quando comparado ao controle, os extratos brutos não prolongaram significativamente os tempos dos ensaios, com exceção do DJ2 que aumentou significativamente o TTPa.

Tabela 3 - Efeito inibitório dos extratos brutos de algas sobre a coagulação sanguínea.

Tratamento	TP Média ± DP (s)	TTPa Média ± DP (s)
Controle (DMSO 0,7%)	13,5 ± 0,1	29,1 ± 0,4
ADM (800 µg/mL)	13,9 ± 0,5	35,5 ± 0,4
ADMPP (800 µg/mL)	13,7 ± 0,2	27,8 ± 5,3
ADMHM (800 µg/mL)	13,9 ± 0,1	26,4 ± 7,0
ADMIE (800 µg/mL)	15,5 ± 0,1	26,7 ± 1,9
ADA (800 µg/mL)	14,8 ± 0,1	30,3 ± 0,3
AGS (800 µg/mL)	15,6 ± 0,3	26,9 ± 0,6
AIC (800 µg/mL)	16,5 ± 0,2	32,8 ± 5,3
AAM (800 µg/mL)	15,0 ± 0,0	27,0 ± 3,6
APD (800 µg/mL)	15,5 ± 0,4	32,9 ± 1,4
AP27 (800 µg/mL)	16,8 ± 1,1	28,6 ± 4,1
AP47 (800 µg/mL)	13,1 ± 0,5	26,0 ± 3,8
AP49 (800 µg/mL)	14,1 ± 0,3	27,3 ± 3,8
DJ2 (600 µg/mL)	14,3 ± 0,8	43,7 ± 1,1*
DJ4 (600 µg/mL)	15,8 ± 0,7	39,9 ± 2,0
DJ5 (600 µg/mL)	13,7 ± 1,1	30,5 ± 1,0
DJ6 (600 µg/mL)	13,0 ± 0,9	30,5 ± 0,6
DJ7 (600 µg/mL)	13,9 ± 0,2	28,0 ± 0,1
DJ8 (600 µg/mL)	13,5 ± 0,9	27,1 ± 0,9
DJ9 (600 µg/mL)	13,8 ± 0,9	27,5 ± 0,1
DJ10 (600 µg/mL)	16,7 ± 0,2	37,9 ± 0,8
DP2-4 (600 µg/mL)	11,1 ± 1,2	27,4 ± 0,1
DP6 (600 µg/mL)	14,6 ± 0,0	29,8 ± 2,0
DP7 (600 µg/mL)	13,8 ± 0,4	27,8 ± 0,2
DP8 (600 µg/mL)	12,7 ± 0,5	30,7 ± 1,1
DD2 (600 µg/mL)	14,9 ± 0,2	28,7 ± 0,7
DD3 (600 µg/mL)	13,3 ± 0,3	27,4 ± 0,4
DI1 (600 µg/mL)	12,3 ± 0,0	28,8 ± 0,6

TP – tempo de protrombina; TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada; s – segundos; DP – desvio padrão; DMSO – dimetilsulfóxido. (N = 3) *Diferença significativa em relação ao controle (P ≤ 0,05).
Fonte: elaboração própria.

5.2 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE ALGAS MARINHAS SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA.

Com base nos resultados de triagem com extratos brutos, foram selecionados cinco compostos isolados das algas para determinar se esses seriam os responsáveis pela atividade antiagregante ou anticoagulante apresentada pelos seus extratos brutos. Dessa forma, foi analisado o potencial antiagregante e anticoagulante de quatro compostos isolados extraídos de algas da espécie *Dictyopteris jolyana* (DJ12, DJ13, DJ14, DJ17) e um extraído de algas da espécie *Desmarestia menziesii* J. Agardh (AP1).

Assim como a maioria dos extratos brutos, nenhum dos compostos isolados alterou significativamente o TP e o TTPa (Tabela 4).

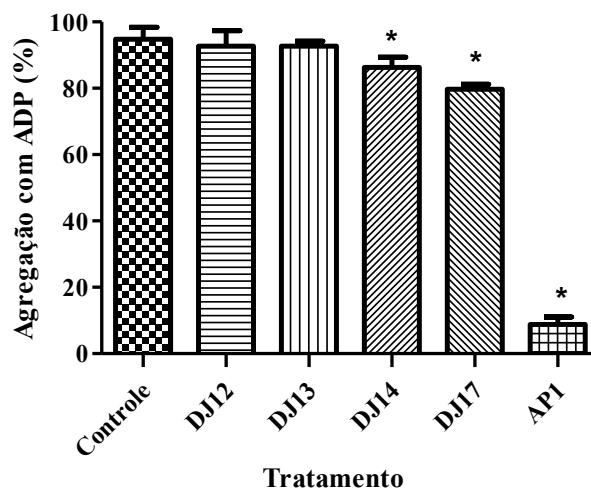
Tabela 4 - Efeito dos compostos isolados (500 μ M) sobre a coagulação sanguínea.

Tratamento	TP Média \pm DP (s)	TTPa Média \pm DP (s)
Controle (DMSO 0,7%)	13,5 \pm 0,1	29,1 \pm 0,4
DJ12	12,6 \pm 0,4	28,9 \pm 0,4
DJ13	13,6 \pm 0,9	31,5 \pm 2,4
DJ14	12,6 \pm 0,3	31,8 \pm 1,2
DJ17	13,5 \pm 0,7	29,8 \pm 0,1
AP1	15,4 \pm 0,2	30,3 \pm 1,6

TP – tempo de protrombina; TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada; s – segundos; DP – desvio padrão; DMSO – dimetilsulfóxido. (N = 3) *Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$).
Fonte: elaboração própria.

Na Figura 8 pode-se observar o efeito da incubação dos compostos isolados sobre a agregação estimulada por ADP. Dentre os compostos estudados, DJ14 (86,3 \pm 3,1%), DJ17 (77,5 \pm 4,5%) e AP1 (8,8 \pm 2,2%) inibiram significativamente a agregação induzida por ADP quando comparado ao controle (94,8 \pm 3,6%).

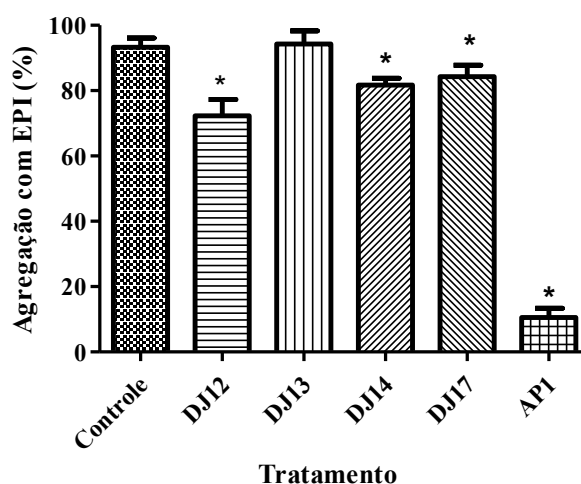
Figura 6 - Efeito inibitório dos compostos isolados (500 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 6 μ M).



Controle - dimetilsulfóxido 0,6%. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). *Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Fonte: elaboração própria.

Quando utilizada a epinefrina como agonista (Figura 9), os compostos DJ12 (74,8 \pm 6,3%), DJ14 (79,0 \pm 4,2%), DJ17 (83,4 \pm 6,3%) e AP1 (10,5 \pm 2,9%) inibiram significativamente a agregação plaquetária quando comparado ao controle (93,3 \pm 2,8%).

Figura 7 – Efeito inibitório dos compostos isolados (500 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina (6 μ M).



Controle - dimetilsulfóxido 0,6%. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3). *Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Fonte: elaboração própria.

Visto que o AP1 foi o composto com melhor atividade antiagregante, ele foi então selecionado para dar prosseguimento aos demais experimentos do estudo.

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AP1 SOBRE AS PLAQUETAS

Após o tratamento do PRP com AP1 (500 μ M), $96,10 \pm 0,07\%$ das plaquetas permaneceram viáveis, enquanto nos controles positivo e negativo foram encontradas $4,00 \pm 0,49\%$ e $97,9 \pm 0,56\%$ de plaquetas viáveis, respectivamente.

5.4 ATIVIDADE DE AP1 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E COLÁGENO

Os resultados estão apresentados na Tabela 5 com os respectivos percentuais de agregação do PRP frente aos diferentes agonistas após tratamento com o composto AP1 (500 μ M). Como pode ser observado, quando comparado com o controle, o composto isolado inibiu significativamente a agregação induzida pelos dois estímulos utilizados.

Tabela 5 - Efeito inibitório do composto AP1 (500 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA - 500 μ M) e colágeno (COL - 2 μ g/mL).

Tratamento	AA	COL (%)
	Média \pm DP (%)	Média \pm DP (%)
Controle (DMSO 0,6%)	93,0 \pm 4,8	90,7 \pm 3,9
AP1	10,0 \pm 2,0*	11,3 \pm 5,3*

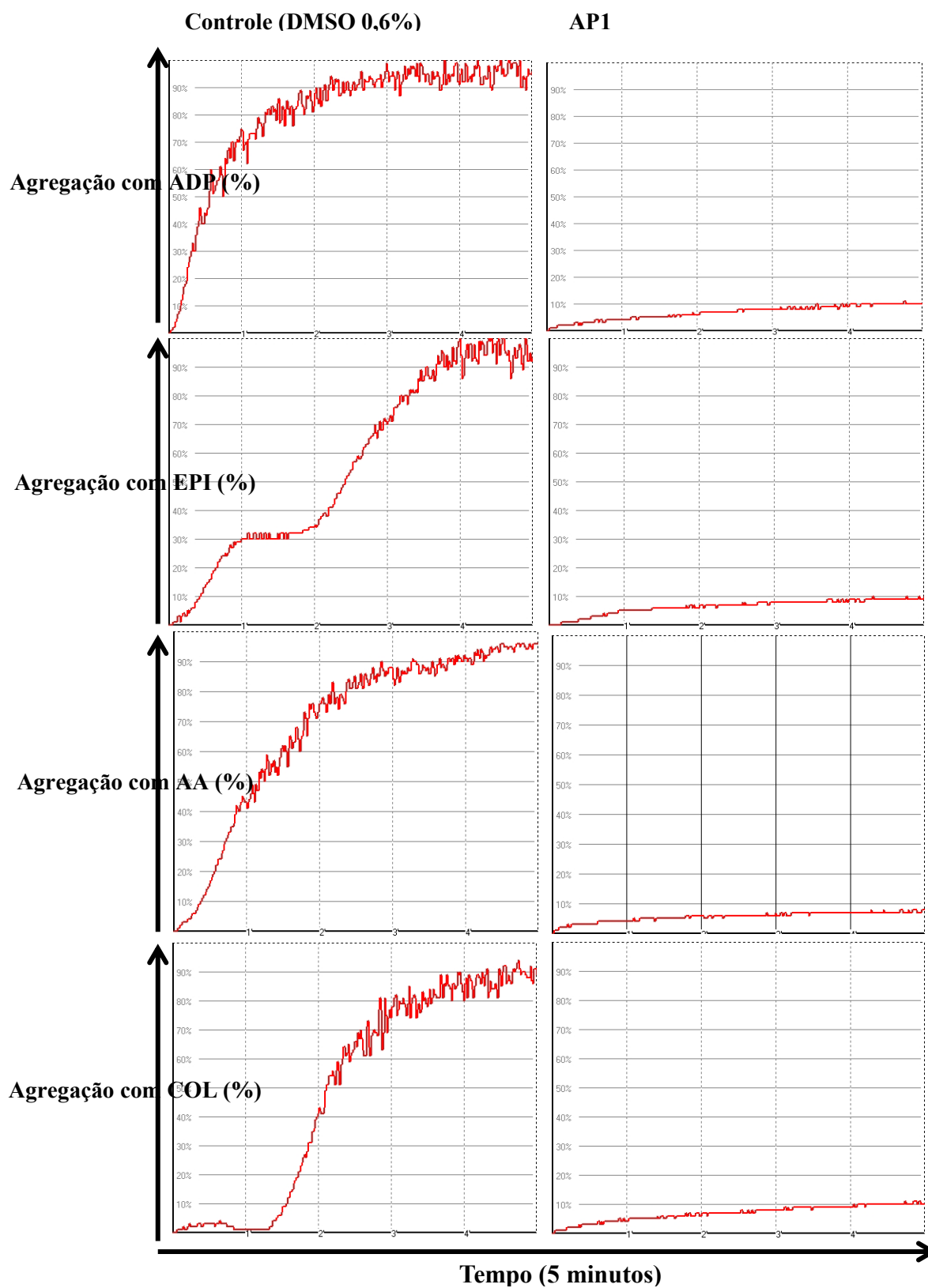
DMSO - dimetilsulfóxido; DP – desvio padrão. (N = 3) * Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Fonte: elaboração própria.

5.5 EFEITO DE AP1 SOBRE OS PERFIS DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito de AP1 (500 μ M) sobre a dissociação da primeira e segunda onda de agregação induzida por ADP, epinefrina, AA e colágeno. Quando comparadas com as curvas dos controles e os perfis característicos de cada

agonista, pode-se verificar que AP1 inibiu totalmente a segunda onda de agregação e parcialmente a primeira onda (Figura 10).

Figura 8 - Efeito do composto AP1 (500 μ M) sobre o perfil e agregação plaquetária induzida pelos agonistas difosfato de adenosina (ADP - 6 μ M), epinefrina (EPI - 6 μ M), ácido araquidônico (AA - 500 μ M) e colágeno (COL - 2 μ g/mL).

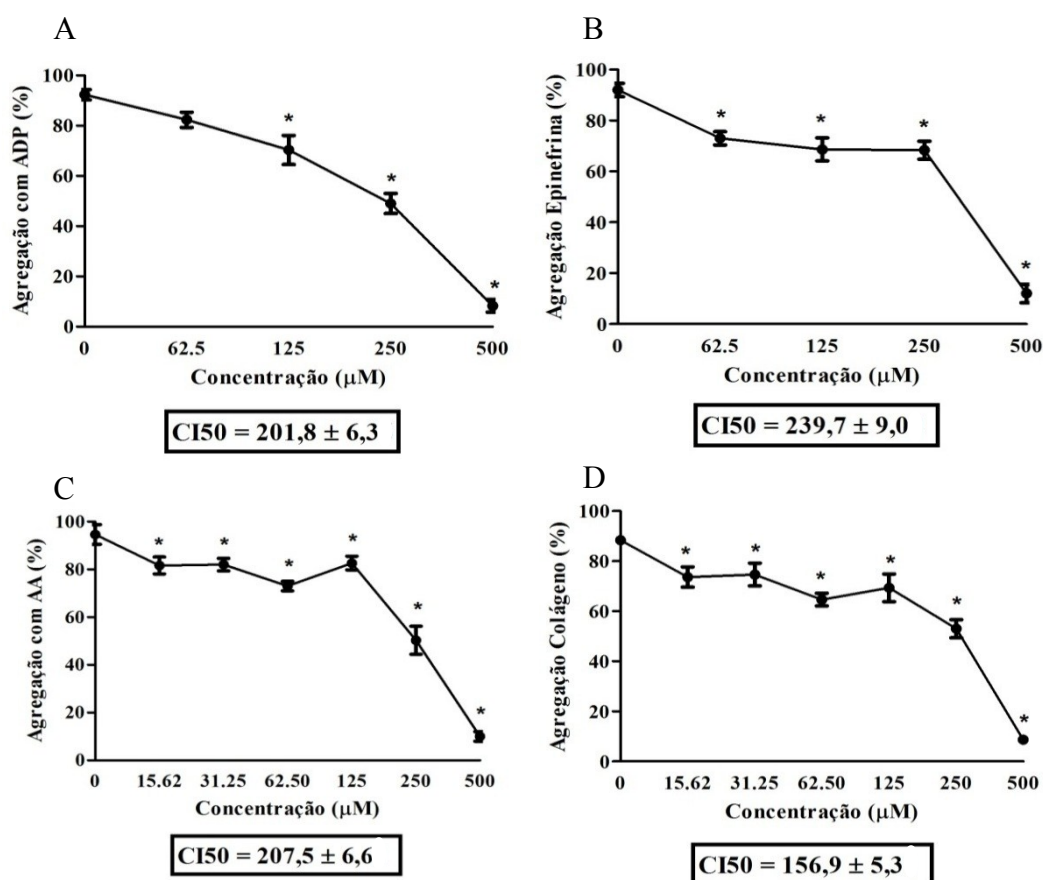


Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: elaboração própria.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CI_{50}

Para verificar se a atividade antiagregante de API era concentração-dependente e determinar a sua CI_{50} , o ADP, a epinefrina, o AA e o colágeno foram utilizados como agonistas (Figura 11). Como se pode observar, a inibição da agregação plaquetária foi concentração-dependente para todos os agonistas. A menor CI_{50} obtida foi para o colágeno ($156,9 \pm 5,4 \mu\text{M}$) e a maior para a epinefrina ($239,7 \pm 9,0 \mu\text{M}$).

Figura 9 - Curvas de agregação plaquetária induzida pelos agonistas em função da concentração de API.



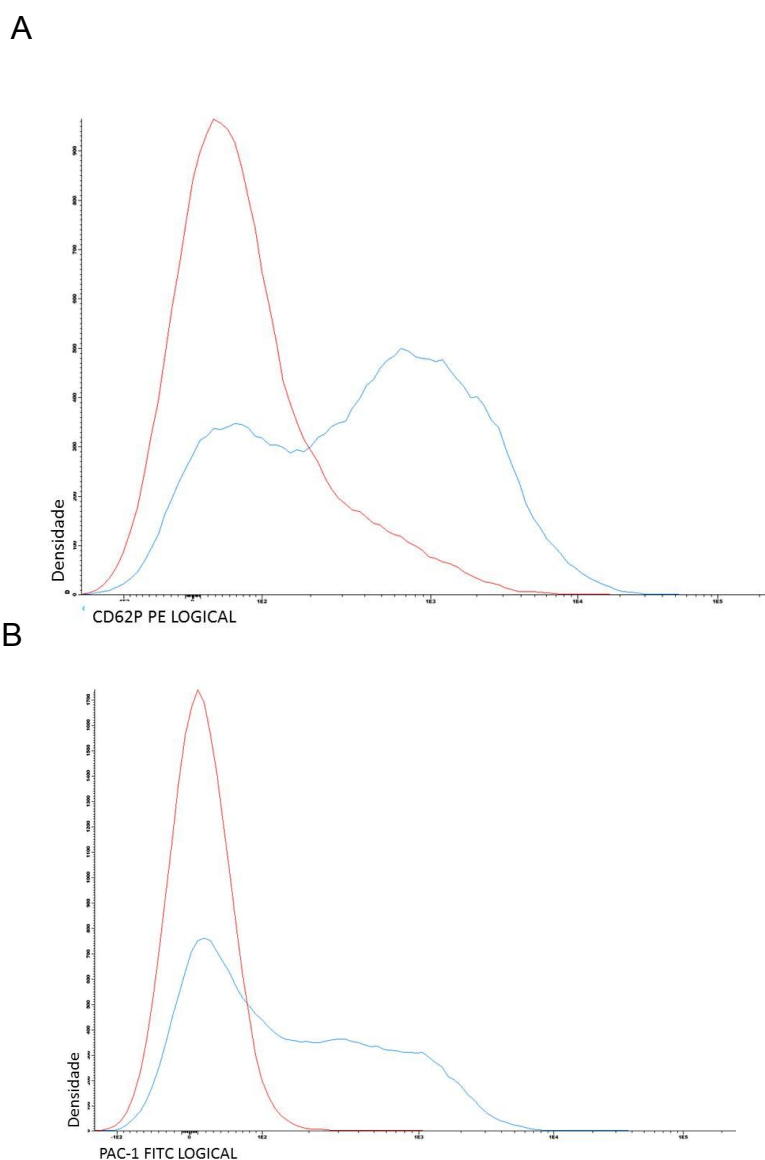
Painel A - Curva de agregação concentração-dependente induzida por difosfato de adenosina (ADP – 6 μM). Painel B: Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina (EPI – 6 μM). Painel C: Curva de agregação concentração-dependente induzida por ácido araquidônico (AA – 500 μM). Painel D: Curva de agregação concentração-dependente induzida por colágeno (COL – 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). *Diferença significativa em relação ao controle contendo apenas DMSO 0,6% (P \leq 0,05). Fonte: elaboração própria.

5.7 ATIVIDADE DE AP1 SOBRE A EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA

Com o objetivo de investigar como o composto isolado atua sobre a agregação, foi avaliado se o tratamento com AP1 (500 μ M) afetava a ativação plaquetária. Para isso, verificou-se se o composto alterava a expressão membranar de P-selectina e a ativação da GpIIb/IIIa, através da marcação de plaquetas com anti-CD62P e anti-PAC1 estimuladas com ADP.

O tratamento com AP1 inibiu em 100% a expressão de PAC-1 e em 96,7% a de CD62P (Figura 12).

Figura 10 – Efeito de AP1 sobre a expressão membranar da GpIIb/IIIa ativada (PAC-1) e de P-selectina (CD62P) em plaquetas estimuladas com difosfato de adenosina (ADP).

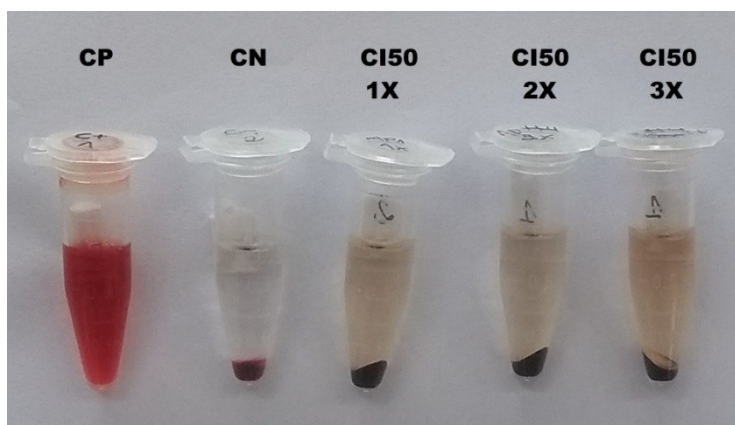


Histogramas do efeito de AP1 sobre a expressão de CD62P (Painel A) e de PAC-1 (Painel B). Azul – controle (DMSO 0,6 %); vermelho – AP1 (500 μ M). Fonte: elaboração própria.

5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO

Para esse ensaio, foram utilizadas as concentrações de uma vez a maior CI_{50} (239,7 μ M), duas vezes a maior CI_{50} (479,4 μ M) e três vezes a maior CI_{50} (719,1 μ M) e os percentuais de hemólise calculados foram de $1,74 \pm 0,43\%$, $2,59 \pm 1,14\%$ e $3,96 \pm 0,37\%$, respectivamente. Na Figura 13 está representada uma imagem do efeito hemolítico de AP1.

Figura 11 - Efeito hemolítico de AP1 em diferentes concentrações.

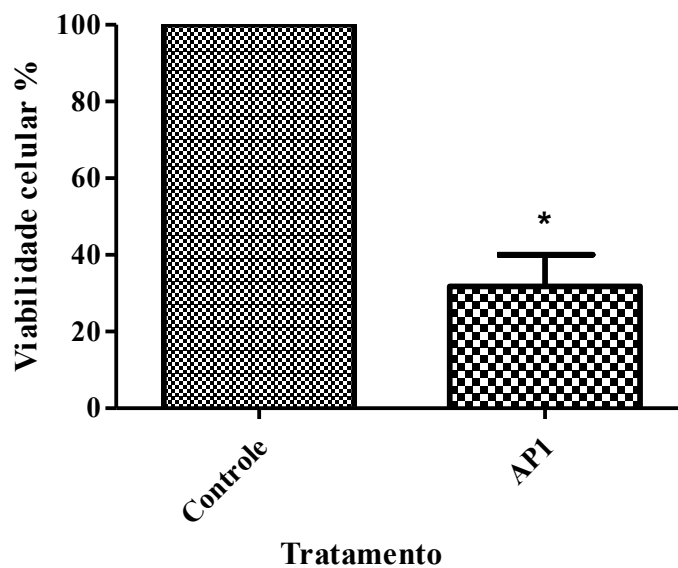


CN - controle negativo com dimetilsulfóxido 0,6% (0% hemólise); CP - controle positivo com água destilada (100% hemólise); CI50 1x – AP1 na concentração de 239,7 μM ; CI50 2x - AP1 na concentração de 479,4 μM ; CI50 3x - AP1 na concentração de 719,1 μM . Imagem ilustrativa de um experimento de três. Fonte: elaboração própria.

5.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AP1 EM CÉLULAS MONONUCLEADAS HUMANAS.

Com o intuito de verificar o possível efeito citotóxico de AP1, células mononucleadas de indivíduos clinicamente saudáveis foram incubadas com 500 μM do composto por 24 horas. Como pode ser observado na Figura 14, a viabilidade celular após 24 horas de tratamento com AP1 ($31,80 \pm 8,20\%$) foi significativamente reduzida quando comparado ao controle.

Figura 12 - Efeito citotóxico de AP1 (500 μ M) sobre células mononucleadas de indivíduos clinicamente saudáveis.



Controle - dimetilsulfóxido 0,6%. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 6).
*Diferença significativa em relação ao grupo controle ($P \leq 0,05$). Fonte: elaboração própria.

5.10 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL DE AP1

Os parâmetros físico-químicos estimados para AP1 estão apresentado na Tabela 6. Conforme os parâmetros que compõem a regra dos cinco de Lipinski, a molécula AP1 pode apresentar boa biodisponibilidade oral, pois infringe apenas uma regra das cinco de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), ele possui miLogP maior que 5,00. Ao contrário de AP1, os fármacos AAS e clopidogrel, usualmente utilizados na clínica como antiagregantes por via oral, não violam nenhuma regra.

Tabela 6– Propriedades físico-químicas de AP1, AAS e clopidogrel calculadas utilizando Molinspiration Cheminformatics.

Parâmetro	Regra	AP1	AAS	Clopidogrel
miLogP*	$\leq 5,00$	7,10	1,43	3,68
TPSA	-	54,37	63,60	29,54
N átomos	-	30	13	21
MM*	< 500	410,60	180,16	321,83
nON*	≤ 10	3	4	3
nOHNH*	≤ 5	1	1	0
Volume	-	429,28	155,57	273,40
N rotb	< 10	11	3	4
N violações	≤ 1	1	0	0

AAS – ácido acetilsalicílico; miLogP – predição de LogP desenvolvida por Molinspiration; TPSA – área de superfície polar topológica; 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 rotacionáveis; N violações – número de violações da regra dos cinco de Lipinski.
*Parâmetros considerados por Lipinski na regra dos cinco. Fonte: elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A hemostasia é um processo fisiologicamente dinâmico que envolve a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea e tem como importante função a formação de um trombo que irá interromper um sangramento diante de uma lesão vascular. Uma vez que esse processo encontra-se descontrolado, a geração de trombos espontâneos pode resultar em eventos tromboembólicos e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o que pode levar ao óbito (KRIZ; RINDER; RINDER, 2009; REIS *et al.*, 2003).

As doenças cardiovasculares são consideradas uma das principais causas que contribuem para a morbidade e mortalidade no século XXI (WALTENBERGER *et al.*, 2016). Atualmente, as terapias antitrombóticas utilizadas se baseiam em diversos mecanismos e, apesar de sua ampla utilização, esses fármacos ainda apresentam limitações e efeitos adversos, incluindo sangramentos e desenvolvimento de resistência (PEREIRA *et al.*, 2017; WALTENBERGER *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o interesse na busca de novos compostos, bem como novos alvos farmacológicos que possam ser eficazes no tratamento e prevenção desses distúrbios, se faz necessária. Nas últimas décadas, produtos naturais têm atraído a atenção de pesquisadores que buscam novas moléculas úteis para a prevenção ou o tratamento de doenças cardiovasculares (NEWMAN; CRAGG, 2016). Nos últimos anos, estudos relatam o potencial biotecnológico de metabólitos de organismos marinhos na indústria e medicina. Esses metabólitos têm sido descritos com diferentes atividades biológicas, incluindo atividade antiplaquetária, anticoagulante e antitrombótica (MOURA *et al.*, 2014; SHOBHARANI *et al.*, 2014).

Dessa forma, o presente estudo objetivou verificar se algas pardas provenientes da costa brasileira e da Antártida possuíam metabólitos com atividade sobre a hemostasia humana. Para tanto, foi realizada uma triagem utilizando-se extratos brutos de algas pardas, em que foi avaliado se o tratamento com o respectivo extrato era capaz de alterar significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP e/ou epinefrina (hemostasia primária), ou TP e/ou TTPa (hemostasia secundária). Os resultados demonstraram que 15 extratos brutos inibiram significativamente a agregação frente ao ADP e/ou epinefrina (Tabela 2), sugerindo que esses extratos possuíam constituintes em sua composição capazes de inibir a hemostasia primária. Resultados semelhantes foram encontrados por Syracuse (2017), que reportou que o extrato bruto de *D. jolyana* (600

$\mu\text{g/mL}$) inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP ($19,5 \pm 3,5\%$) e epinefrina ($67,0 \pm 2,8\%$). No presente estudo, de oito extratos brutos de *D. jolyana* avaliados, apenas um (DJ10) inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por esses dois agonistas (ADP - $56,3 \pm 2,2\%$; epinefrina - $57,8 \pm 6,6\%$), sendo que essa inibição não foi tão intensa quanto a reportada por Syracuse (2017). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que as algas utilizadas nos dois estudos foram coletadas em anos, meses e locais diferentes, o que pode ter influenciado os tipos e concentrações de seus metabólitos. Isso poderia explicar também porque, no presente trabalho, os extratos provenientes de algas do mesmo gênero apresentaram efeitos distintos sobre a agregação, como foi o caso dos extratos de *D. jolyana*, *D. plagiogramma* e *D. delicatula*.

Estudos realizados por Magalhães e cols (2011) e Moura e cols (2011) relataram a atividade anticoagulante sobre o TTPa de outras espécies de *Dictyopteris*. Ao avaliar a hemostasia secundária, no presente estudo foi observado que os extratos brutos não prolongaram significativamente os TP e TTPa, com exceção do DJ2 que aumentou significativamente o TTPa (Tabela 3). Sendo assim, é possível sugerir que o extrato DJ2 foi capaz de inibir especificamente a via intrínseca da coagulação. Isso reforça os achados dos estudos anteriormente citados. Fisiologicamente, os estímulos que iniciam e mantêm os processos de agregação e coagulação sanguínea são muito diferentes entre si (VERSTEEG *et al.*, 2013) o que torna possível que os compostos que atuam sobre uma fase específica da hemostasia não apresentem o mesmo efeito sobre a outra fase. Alguns estudos já demonstraram que extratos brutos de plantas apresentavam atividade antiagregante, porém não atuavam sobre a coagulação (DO *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2010), e o inverso também já foi relatado (MAGALHAES *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). No entanto, como os extratos brutos são constituídos por uma mistura de compostos, é possível que um extrato bruto apresente as duas atividades simultaneamente. Moura e cols. (2011) demonstraram esse fato em seu estudo com extratos brutos de algas pardas, incluído o gênero *Dictyota*, em que alguns extratos testados apresentavam atividade antiagregante e anticoagulante.

Tendo em vista o potencial antitrombótico de alguns extratos brutos avaliados, foram selecionados cinco compostos isolados de algas cujos extratos inibiram significativamente a agregação, para determinar se esses seriam os responsáveis pela atividade antiagregante ou anticoagulante apresentada pelos extratos. Dessa forma, foi analisado o potencial antiagregante e anticoagulante de quatro compostos isolados

extraídos de algas da espécie *D. jolyana*, identificados como DJ12, DJ13, DJ14 e DJ17, e um extraído de algas da espécie *D. menziesii*, denominado AP1. O gênero *Dictyopteris sp* compreende algas marinhas pardas pertencentes à família Dictyotaceae. Este gênero encontra-se amplamente distribuído nos mares tropicais e subtropicais, com ocorrência nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico e parece ter um número maior de espécies nos oceanos tropicais (NUNES; PAULA, 2006). A *D. menziesii* é uma macroalga parda que pertence ao gênero Desmarestiaceae e é encontrada na Península Antártica (GUIRY, 2019; GOMEZ; HUOVINEN, 2015).

Assim como a maioria dos extratos brutos, nenhum dos compostos isolados alterou significativamente os tempos da coagulação (Tabela 4). Já a agregação induzida por ADP foi inibida significativamente pelos compostos isolados DJ14, DJ17 e AP1 (Figura 7). Ao estimular a agregação com epinefrina, os compostos DJ12, DJ14, DJ17 e AP1 inibiram significativamente a agregação plaquetária (Figura 8), sendo que o composto AP1 apresentou melhor potencial antiagregante frente aos dois estímulos. Com base nos resultados, sugere-se que os compostos DJ12, DJ14 e DJ17 podem ser em parte responsáveis pela atividade antiagregante dos extratos brutos de *D. jolyana*, enquanto o composto AP1 pode ser responsável pela atividade de *D. menziesii*.

Farmacologicamente, o fármaco ideal deve ter alta atividade antiplaquetária e nenhum efeito anticoagulante, haja vista que moléculas com ambas as atividades apresentam maior risco de efeitos adversos como hemorragias graves (HOFFBRAND; MOSS, 2013). Com isso, o fato de que os compostos isolados testados no presente estudo afetaram apenas a hemostasia primária, torna essas moléculas interessantes para dar continuidade às investigações.

Visto que o AP1 foi o composto com melhor atividade antiagregante, esse foi então selecionado para dar prosseguimento aos demais experimentos do presente trabalho. O composto AP1, ou hidroxisargaquinona, é uma plastoquinona (RIVERA *et al.*, 1989). Em algas, fisiologicamente, as plastoquinonas atuam no transporte de elétrons na fotossíntese oxigênica, na biossíntese de carotenóides e giberelina (hormônio de crescimento), na eliminação de radicais livres, e na regulação indireta da sinalização celular e da expressão gênica através da geração de peróxido de hidrogênio (LUI; LU, 2016). Esse composto foi isolado pela primeira vez da alga parda *Sargassum tortile*, coletada na costa do Japão em outubro de 1985, por Numata e cols (1992), que também reportaram sua atividade citotóxica sobre células de leucemia linfocítica (P-

388). Não foram encontrados trabalhos na literatura consultada que avaliassem o efeito desse composto sobre a hemostasia humana.

Com o intuito de verificar se os resultados obtidos na agregação plaquetária eram de fato atribuídos aos efeitos inibitórios de AP1 sobre os mecanismos de ativação e/ou agregação plaquetária e não a uma possível toxicidade, foi avaliado se o composto afetava a viabilidade de plaquetas. Como se pode verificar, AP1 diminuiu a viabilidade plaquetária em menos de 5%, o que sugere que a atividade antiagregante encontrada não ocorre devido a uma expressiva perda da viabilidade e sim, provavelmente, porque o composto atue inibindo ou interferindo em mecanismos de ativação e agregação plaquetária.

Na tentativa de melhor compreender o mecanismo de ação de AP1, além de ADP e epinefrina, foram incluídos no estudo outros dois agonistas, AA e colágeno, que possuem diferentes alvos e vias de ativação plaquetária. O ADP e a epinefrina ligam-se aos seus receptores específicos (P2Y₁₂ e alfa-adrenérgicos, respectivamente) acoplados à proteína G, o que irá inibir a adenilato ciclase (AC) e ativar a fosfoinositídeo 3 quinase (PI3K). A inibição da AC leva a diminuição da concentração citoplasmática de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o que proporciona a ativação plaquetária. Já a ativação de PI3K ativa a fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, hidrolisa o PIP₂ em DAG e IP₃, ativando a plaqueta pelo aumento da concentração citoplasmática de cálcio. Adicionalmente, o ADP também é capaz de se ligar ao receptor P2Y₁, também acoplado à proteína G, que é capaz de igualmente ativar a PLC (BROOS *et al.*, 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013; SHEN *et al.*, 2017).

O AA é um substrato da enzima COX-1 plaquetária e sua metabolização gerará prostaglandinas que são substratos para a enzima tromboxano sintetase, produzindo TXA₂, um agonista que ativa plaquetas por meio de receptores específicos (PAR1 e PAR4) acoplados à proteína G e capazes de ativar a plaqueta pela via da PLC, da PI3K e da AC (BROOS *et al.*, 2011; GURNEY, 2016). Os principais receptores de colágeno são o GpVI e o α 2 β 1. A via de sinalização exata que leva à ativação α 2 β 1 ainda não está completamente compreendida, mas sugere-se que envolva a sinalização de GpVI e/ou a ativação prévia de GpIIb/IIIa. A ativação plaquetária através do GpVI depende da ativação em cascata de tirosinas quinases que culmina na ativação da tirosina quinase Syk que ativa PLC, dessa forma, o colágeno é capaz de ativar a PLC de maneira independente de proteína G (BROOS *et al.*, 2011; GURNEY, 2016; JOOSS *et al.*, 2019; RIVERA *et al.*, 2009).

Como pôde ser observado na Tabelas 5, o AP1 promoveu a inibição significativa da agregação plaquetária frente aos agonistas utilizados. Adicionalmente, ao observar as curvas de concentração-resposta, pode-se dizer que a atividade do composto foi concentração dependente para todos os agonistas e que as CI_{50} foram semelhantes entre si (Figura 11). Esses dados sugerem que o mecanismo de ação de AP1 está relacionado com o bloqueio ou com a interferência de uma via ou intermediário de ativação plaquetária comum a todos os estímulos utilizados.

Um recente estudo publicado por Firsov e cols (2018) demonstrou que uma plastoquinona era capaz de atuar carreando AMPc através de membranas plasmáticas. Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais claro que a via de sinalização do AMPc usa um sistema de compartimentalização em microdomínios da célula como uma estratégia para coordenar o grande número de funções celulares chave sob seu controle. O confinamento espacial permite a formação de “pontos quentes” de sinalização de AMPc em domínios subcelulares discretos em resposta a estímulos específicos, trazendo a informação na proximidade dos efetores relevantes e seus receptores, alcançando assim especificidade de ação. Alguns desses *pools* individuais de AMPc parecem estar associados a diferentes organelas e regiões celulares, como retículo sarcoplasmático, mitocôndria, núcleo e membrana plasmática (BURDYGA *et al.*, 2018; GHIGO; MIKA, 2019; LEFKIMMIATIS; ZACCOLO, 2014). Estudos sugerem que a compartimentalização de nucleotídeos cíclicos também pode controlar aspectos da função plaquetária, contudo, mais estudos são necessários para estabelecer a organização espacial e temporal da sinalização de AMPc em plaquetas e como isso interfere na sinalização ativadora de plaquetas (WILSON *et al.*, 2008; RASLAN; ABURIMA; NASEEM, 2015).

Por ser uma plastoquinona, é possível que AP1 também atue como carreadora do AMPc, alterando as concentrações desse em microdomínios específicos e, dessa forma, interferindo na ativação plaquetária. Nas plaquetas humanas, o principal alvo do AMPc é a proteína quinase A (PKA), que é constitutivamente inativa. Quando sofre ação do AMPc, a PKA ativa-se e torna-se capaz de fosforilar seus substratos. Um dos substratos conhecidos da PKA nas plaquetas é o receptor de IP3 (IP3r) que medeia a liberação de cálcio do sistema tubular denso. Na sua forma fosforilada, o IP3r é inativo, o que inibe a liberação de cálcio (NOÉ *et al.*, 2010). Dessa forma, quando as concentrações citoplasmáticas de AMPc diminuem, devido, por exemplo, a ligação de ADP e epinefrina a seus receptores, ocorre a ativação plaquetária pela liberação de

cálcio do sistema tubular denso (BROOS *et al.*, 2011; NOÉ *et al.*, 2010; RASLAN; ABURIMA; NASEEM, 2015; SMOLENSKI, 2012). As vias de sinalização ativadas pelos receptores de TXA2 e colágeno não interferem diretamente nas concentrações de AMPc, contudo, elas levam a geração de IP3 que irá se ligar ao seu receptor e promover a ativação plaquetária (BROOS *et al.*, 2011). Deste modo, a alteração das concentrações de AMPc em microdomínios e consequente inibição de IP3r seria capaz de interferir na ativação plaquetária induzida por esses agonistas também.

A agregometria por transmissão de luz é uma metodologia amplamente utilizada para a avaliação da hemostasia primária. Nesses ensaios, a primeira onda de agregação refere-se à resposta das plaquetas a estímulos exógenos, dessa forma, alterações em receptores específicos de agonistas, no receptor GpIIb/IIIa e na transdução de sinais podem causar alterações nessa onda. A segunda onda de agregação demonstra a resposta plaquetária a estímulos endógenos e alterações no metabolismo do AA e na liberação do conteúdo dos grânulos pode interferir na amplitude da segunda onda (BORN, 1962; O'BRIEN, 1962). Com isso, além do percentual de agregação, é também importante avaliar a dissociação da primeira e segunda onda de agregação induzida pelos agonistas em presença de AP1. Ao analisar os perfis de curvas de agregação gerada pelos agonistas (Figura 10), nota-se que o tratamento com AP1 inibiu totalmente a segunda onda de agregação e quase que totalmente a primeira onda. Portanto, é possível sugerir que AP1 possa estar interferindo nos mecanismos relacionados com a resposta exógena da plaqueta. Esses dados corroboram a hipótese de que AP1 esteja interferindo nos mecanismo de transdução de sinais pelo carreamento de AMPc.

Como mencionado, existem diferentes vias que contribuem para a ativação plaquetária. Quando ocorre sinalização suficiente para ativação plaquetária, o receptor GpIIb/IIIa sofre uma alteração em sua conformação de baixa afinidade para um estado de alta afinidade (forma ativa), facilitando a agregação plaquetária e levando a formação de um trombo rico em plaquetas. Semelhantemente, o aumento da sinalização pró-agregante acarreta mudanças conformacionais da plaqueta o que propicia a exocitose granular (HARRISON *et al.*, 2011; YIP *et al.*, 2014). Dessa forma, a determinação da expressão membranar de P-selectina, marcador de secreção de grânulos- α plaquetários, e de ativação da GpIIb/IIIa, através da marcação de plaquetas com anti-CD62P e anti-PAC1, respectivamente, pode ser utilizado como marcador de ativação plaquetária (LANDI; MARQUES JÚNIOR, 2003). Dessa forma, com o objetivo de verificar se

AP1 era capaz de inibir a ativação plaquetária, verificou-se se o tratamento do PRP com o composto alterava a expressão membranar desses dois marcadores.

Ao analisar os dados de citometria de fluxo (Figura 12), constatou-se que AP1 diminuiu em quase 100% a expressão de ambos marcadores, o que demonstra que houve inibição da ativação da plaqueta. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que AP1 interfere na via de ativação do AMPc, haja vista que a secreção plaquetária e a ativação da GpIIb/IIIa é dependente da mobilização do cálcio citoplasmático via ligação de IP3 ao seu receptor (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; NOÉ *et al.*, 2010). O carreamento do AMPc também pode estar inibindo a ativação da GpIIb/IIIa pelo aumento da fosforilação da proteína estimulada por vasodilatador (VASP), uma vez que, na sua forma fosforilada, a VASP (VASP-P) inibe a ativação desse receptor (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; ITO *et al.*, 2018). Não foram encontrados na literatura estudada trabalhos que avaliassem a expressão desses marcadores em plaquetas tratadas com plastoquinonas.

Diante da promissora atividade antiagregante de AP1, considerou-se interessante avaliar o potencial de sua utilização em testes *in vivo*. Desse modo, nesse estudo, foi avaliado se AP1 causava hemólise ou era citotóxico para células mononucleadas do sangue de indivíduos clinicamente saudáveis. Para esses ensaios, utilizaram-se concentrações maiores ou iguais a maior CI₅₀ calculada (239,7 µM).

O sangue é um dos principais tecidos com o qual os compostos entram em contato após administração sistêmica. Desse modo, a avaliação do potencial de hemólise *in vitro* foi utilizada para quantificar o efeito deletério de AP1 sobre a membrana das hemácias. Segundo o *Standart Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials* (2008 apud BAUER *et al.*, 2012), AP1 foi classificado como não hemolítico (1,74 ± 0,43%) de sua maior CI₅₀, e ligeiramente hemolítico nas concentrações de duas e três vezes a sua maior CI₅₀ (2,59 ± 1,14% e 3,96 ± 0,37%, respectivamente). Esses resultados sugerem que AP1 é um potencial candidato para realização de estudos *in vivo* (KLOYPAN *et al.*, 2019; OOI *et al.*, 2019)

Assim como a avaliação da hemocompatibilidade, a investigação de citotoxicidade para células saudáveis é um parâmetro importante a ser considerado. Nesse sentido, a viabilidade de células mononucleadas de indivíduos saudáveis foi avaliada após 24 h de incubação com o composto. O AP1 apresentou efeito citotóxico significativo na concentração de 500 µM (Figura 14), o que pode representar um fator limitador para a utilização desse composto em ensaios *in vivo*. O carreamento do AMPc

por membranas plasmáticas pode também ser o responsável por esse efeito citotóxico encontrado (BURDYGA *et al.*, 2018; GHIGO; MIKA, 2019; LEFKIMMIATIS; ZACCOLO, 2014).

Medicamentos usados clinicamente também apresentam toxicidade relacionada a eles, e isso não inviabilizou as suas utilizações. Maseneni e cols (2013) demonstraram que os tienopiridínicos apresentavam mielotoxicidade significativa a partir de concentrações de 10 μM . Freitas e cols (2017) relataram a hepatotoxicidade do clopidogrel a células do tipo HepG2, com concentrações de 50 a 100 μM . Assim como AP1, os tienopiridínicos, como o clopidogrel, também podem ser considerados reguladores de AMPc, uma vez que a inibição de P2Y12 promovida por esses fármacos leva ao aumento da concentração plaquetária de AMPc. No presente estudo, o composto AP1 foi testado em concentração superior às avaliadas nos trabalhos de Maseneni e cols (2013) e Freitas e cols (2017). Desse modo, apesar da citotoxicidade apresentada por AP1, sugere-se que o composto ainda possa ser testado *in vivo*.

Para um fármaco antiagregante, a biodisponibilidade oral é interessante, pois facilita a adesão ao tratamento quando comparado com os medicamentos aplicados por via sistêmica (MARQUES; PIERIN, 2008). Dessa forma, considerou-se interessante realizar a predição da biodisponibilidade oral de AP1. As características de solubilidade do composto foram pressupostas segundo os parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski e cols (2001). Os parâmetros estruturais seguem a “regra dos cinco” de Lipinski e as regras de Veber, que objetivam estimar teoricamente a biodisponibilidade oral de fármacos, supondo a influência da estrutura química na permeabilidade do composto (LIPINSKI *et al.*, 2001; VEBER *et al.*, 2002). Segundo a regra de Lipinski, uma molécula candidata a fármaco será possivelmente ativa oralmente se apresentar cinco ou menos grupos doadores da ligação de H (nOHNH); 10 ou menos grupos aceptores de ligação de H (nON); se seu peso molecular for menor ou igual a 500 g/mol; e se seu coeficiente de partição octanol-água (Clog P) menor ou igual a cinco (ou $\text{miLog } P \leq 5,00$). Ao violar mais de um desses parâmetros, é possível que problemas de absorção sejam encontrados (LIPINSKI *et al.*, 2001; MIGNANI *et al.*, 2018).

As moléculas de clopidogrel e AAS, fármacos antiplaquetários usualmente empregados na clínica, não violam nenhum dos parâmetros citados, justificando o uso desses fármacos por via oral. A molécula do composto AP1 viola apenas um parâmetro da “regra dos cinco” de Lipinski (Tabela 6), o que sugere que essa molécula pode apresentar boa biodisponibilidade oral (LIPINSKI *et al.*, 2001). Como já sugerido, a

predição teórica de parâmetros físicos-químicos por meios computacionais são estratégias importantes no estudo de novas moléculas. A partir dos resultados obtidos pelo programa Molinspiration, é possível reforçar que o composto isolado AP1 é uma molécula com potencial para o desenvolvimento de um fármaco antiplaquetário. Contudo, devido à violação de uma das regras e a citotoxicidade apresentada pelo composto, seria interessante obter análogos desses compostos a fim de aperfeiçoar o perfil farmacológico e citotóxico.

Finalmente, os resultados deste trabalho indicam que o composto isolado AP1 não demonstrou ter efeito sobre a coagulação, porém apresenta um efeito antiplaquetário importante, sendo que esse efeito está possivelmente relacionado ao carreamento do AMPc através de membranas plasmáticas. Todavia, mais estudos devem ser realizados a fim de confirmar esse mecanismo de ação.

Desse modo, apesar de serem necessários futuros estudos *in vitro* e *in vivo* para esclarecer o mecanismo de ação e os possíveis efeitos adversos de AP1, os resultados deste trabalho sugerem que esta molécula pode ser utilizada como protótipo para o desenvolvimento de um novo fármaco antitrombótico.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo permite concluir que:

- Quinze extratos brutos de algas marinhas pardas inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP e/ou epinefrina;
- O extrato bruto DJ2 prolongou significativamente o TTPa, sugerindo que esse extrato iniba a ativação dos fatores relacionados à via intrínseca da coagulação;
- Os compostos isolados DJ12, DJ14, DJ17 e AP1 inibiram a agregação plaquetária induzida por ADP e/ou epinefrina, porém não promoveram o prolongamento de TP e de TTPa;
- O composto AP1 foi o composto isolado que apresentou a melhor atividade antiagregante;
- AP1 diminuiu a viabilidade plaquetária em menos de 5%;
- AP1 inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados (ADP, epinefrina, AA e colágeno) de forma concentração-dependente;
- A menor CI_{50} determinada para AP1 foi com o agonista colágeno ($156,9 \pm 5,4 \mu\text{M}$);
- AP1 diminuiu em quase 100% a expressão membranar de P-selectina e de PAC1;
- AP1 é fracamente hemolítico, mesmo quando utilizado na concentração de $719,1 \mu\text{M}$;
- AP1 pode ser citotóxico para células mononucleadas sanguíneas humanas na concentração de $500 \mu\text{M}$;
- Segundo a “regra dos cinco” de Lipinski, AP1 pode apresentar boa biodisponibilidade oral.

Portanto, após a realização desse trabalho, sugere-se que o efeito inibitório promovido por AP1 sobre a agregação plaquetária parece estar relacionado com a interferência nos mecanismos de transdução de sinais pelo carreamento de AMPc, com a inibição da resposta da plaqueta a estímulos exógenos. Os resultados indicam a potencial utilização desse composto proveniente de *D. menziesii* como protótipo de novos fármacos antiagregantes.

8 PERSPECTIVAS

- Estudar o efeito de outros compostos isolados dos extratos brutos que apresentaram atividade significativa sobre a hemostasia;
- Avaliar o efeito de AP1 sobre a expressão de PKA e de VASP fosforiladas por citometria de fluxo ou western blotting;
- Estudar o efeito AP1 em modelos de trombose *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. *et al.* From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. **Front Pharmacol**, Aug 6;9:777, 2018.
- AMIROU, A. *et al.* Effects of *Juglans regia* Root Bark Extract on Platelet Aggregation, Bleeding Time, and Plasmatic Coagulation: *In Vitro* and *Ex Vivo* Experiments. **Evid Based Complement Alternat Med**, Aug 14, 2018.
- 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.
- AVELAR-FREITAS, B.A. *et al.* Trypan Blue Exclusion Assay by Flow Cytometry. **Braz J Med Biol Res**, 47(4): 307-315, 2014.
- BADIMON, L.; VILAHUR, G. Antiplatelets Properties of Natural Products. **Vascul Pharmacol**, set-out, 59 (3-4), 67-75, 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.
- BERGER, J.S. Oral Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of Acute Coronary Syndrome. **Am J Cardiovasc Drugs**, 18 (6): 457-472, 2018.
- BIRIS, N. *et al.* Mapping the Binding Domains of the AlphaIIb subunit. A Study Performed on the Activated Form of the Platelet Integrin AlphaIIbbeta3. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 270, n.18, p.3760-3767, 2003.
- BORN, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**. 194: 927-929, 1962.
- 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, 2015. 127p. Disponível em: <http://www.conass.org.br/biblioteca/pdf/A-Atencao-Primaria-e-as-Redes-de-Atencao-a-Saude.pdf>. Acesso em: 27 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2017 – Uma análise da situação de saúde e os desafios para o alcance dos objetivos de desenvolvimento sustentável. MS, 2018. Disponível em: <http://www.bvsms.saude.gov.br>. Acesso em 22 fev. 2019.

BROOS, K. *et al.* Platelets at Work in Primary Hemostasis. **Blood Rev**, v. 25, n. 4, p. 155-67, Jul, 2011.

BURDYGA, A. *et al.* Phosphatases Control PKA-dependent Functional Microdomains at the Outer Mitochondrial Membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, 10 Jul; 115 (28), 2018.

CAMARA, R.B.G. *et al.* Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cerviconis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. **Mar Drugs**, 9: 124-138, 2011.

CARVALHAL, F. *et al.* Antithrombotics from the Sea: Polysaccharides and Beyond. **Mar Drugs**: 17, 170, 2019.

CHENG, Z. *et al.* Extracellular Signal-regulated Kinase 5 Associates with Casein Kinase II to Regulate GPIb-IX-mediated Platelet Activation via the PTEN/PI3K/Akt Pathway. **J Thromb Haemost.** Aug;15(8):1679-1688, 2017.

CIMMINO, G.; GOLINO, P. Platelet Biology and Receptor Pathways. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 6, n. 3, p. 299-309, Jun 2013.

COLLEN, D.; LIJNEN, H.R. The fibrinolytic system in man. **Crit Ver Oncol Hematol.** 4 (3): 249-301, 1986.

COSTA, S.S. *et al.* Metabólitos Secundários de Origem Vegetal: uma Fonte Potencial de Fármacos Antitrombóticos. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, 172-180, 2010.

DO, J. *et al.* Aqueous Extract of Taegeuk Ginseng Inhibits Platelet Aggregation and Thrombus Formation. **J Med Food**, 00 (0), 1-8, 2018.

ENRIQUEZ, A.; BARANCHUK, A.; CORBALAN, R. Manejo de Hemorragia Asociada a Anticoagulants Orales Directos: Estado Actual de las Estrategias de Reversion. **Rev. Med. Chile**, 147: 73-82, 2019.

FAVALORO, E.J.; LIPPI, G. Venous and Arterial Thromboses: Two Sides of the Same Coin? **Semin Thromb Hemost.** Apr;44(3):239-248. 2018.

FEITOSA, M.P.M. *et al.* Dual Platelet Antiaggregation Therapy After Myocardial Revascularization Surgery. **Rev Assoc Med Bras**, 65 (3): 316-318, 2019.

FEITOSA-FILHO, G.S. *et al.* Atualização das Diretrizes em Cardiogeriatría da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.** 112(5):649-705, 2019.

FIRSOV, A.M. *et al.* A Conjugate of Decyltriphenylphosphonium with Platosquinone can Carry Cyclic Adenosine Monophosphate, but not Cyclic Guanosine Monophosphate, Across Artificial and Natural Membranes. **Biochim Biophys Acta Biomembr**, Feb 1860 (2), 329:334, 2018.

FREDENBURGH, J.C.; GROSS, P.L.; WEITZ, J.L. Emerging Anticoagulant Strategies. **Blood.** Jan 12;129(2):147-154, 2017.

FREITAS *et al.* Modulation of miR-26a-5p and miR-15b-5p Exosomal Expression Associated with Clopidogrel-induced Hepatotoxicity in HepG2 cells. **Front Pharmacology.** 12 Dec, 8:906, 2017.

GARCIA-DAVIS, S *et al.* Anti-*Acanthamoeba* Activity of Brominated Sesquiterpenes from *Laurencia johnstonii*. **Mar Drugs.** Nov 11;16(11), 2018.

GEORGE, S. *et al.* Development of New Antithrombotic Regimens for Patients with Acute Coronary Syndrome. **Clin Drug Investig**, apr 11, 2019.

GHIGO, A; MIKA, D. cAMP/PKA Signaling Compartmentalization in Cardiomyocytes: Lessons from FRET-based Biosensors. **J Mol Cell Cardiol**, Jun; 131: 112-121, 2019.

GOMEZ, I.; HUOVINEN, P. Lack of Physiological Depth Patterns in Conspecifics of Endemic Antarctic Brown Algae: a Trade-off Between UV Stress Tolerance and Shade Adaptation? **Plos One**, Aug 7; 10 (8), 2015.

GUIRGIS, M.; THOMPSON, P.; JANSEN, S. Review of Aspirin and Clopidogrel Resistance in Peripheral Arterial Disease. **J Vasc Surg**, Nov; 66(5): 1576-1586, 2017.

GUIRY, M.D. AlgaeBase, World-wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; pesquisado em 05 Jun 2019.

GURNEY, D. Platelet Function Testing: from Routine to Specialist Testing. **British Journal of Biomedical Science**, [s.l.], v. 73, p. 10-20, 2016.

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.

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

ITO, Y. *et al.* Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) is not a Major Mediator of Platelet Aggregation, Thrombogenesis, Haemostasis, and Antiplatelet Effect of Prasugel in Rats. **Sci Rep**, 2 Jul; 8 (1): 9955, 2018.

JASTRZEBSKA, M. *et al.* Variable Gender-dependent Platelet Responses to Combined Antiplatelet Therapy in Patients with Stable Coronary-artery Disease. **J Physiol Pharmacol**. Aug; 69(4), 2018.

JOOSS, N.J. *et al.* Role of platelet glycoprotein VI and tyrosine kinase syk in thrombus formation on collagen-like surface. *Int J Mol Sci*, 7 Jun; 20 (11), 2019.

KARSENTY, C. *et al.* Risk of Thromboembolic Complications in Adult Congenital Heart Disease: A Literature Review. **Arch Cardiovasc Dis**, Out; 111(10): 613-620; 2018.

KLOYPAN, C. *et al.* *In Vitro* Haemocompatibility of Dextran-protein Submicron Particles. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, Dez, 47(1):241-249, 2019.

KRIZ, N.; RINDER, C. S.; RINDER, H. M. Physiology of Hemostasis: with Relevance to Current and Future Laboratory Testing. **Clin Lab Med**, v. 29, n. 2, p. 159-74, v, Jun 2009.

KU, S. *et al.* Antithrombotic and Profibrinolytic Activities of Isorhamnetin-3-O-galactoside and Hyperoside. **Food Chem Toxicol**; Mar; v.53, p.197-204, 2013.

- 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.
- LEFKIMMIATIS, K.; ZACCOLO, M. cAMP Signaling in Subcellular Compartments. **Pharmacol Ther**, Sep; 143 (3): 295:304, 2014.
- LEITE, P.M.; MARTINS, M.A.P.; CASTILHO, R.O. Review on Mechanisms and Interactions in Concomitant Use of Herbs and Warfarin Therapy. **Biomed Pharmacother**. Oct; 83: 14-21, 2016.
- LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and Computacional Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 46, p. 3-26, 2001.
- LIU,M.;LU,S. Plastoquinone and Ubiquinonein Plants: Biosynthesis, Physiological Funcional and Metabolic Engineering. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-18, 2016.
- LOPEZ, E. *et al.* Evaluation of the Antiaggregant Activity of Ascorbyl Phenolic Esters with Antioxidant Properties. **Journal Of Physiology And Biochemistry**. Cáceres, jun. 2015.
- MAGALHAES, K.D. *et al.* Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. **Int. J. Mol. Sci.** 12, 3352-3365, 2011.
- MARQUES, P.A.C.; PIERIN A.M.G. Fatores que Influenciam a Adesão de Pacientes com Câncer à Terapia Antineoplásica Oral. **Acta Paul Enferm**, 21 (2): 323-9, 2008.
- MASENENI, S. *et al.* Toxicity of Thienopyridines on Human Neutrophil Granulocytes and Lymphocytes. **Toxicology**. 7 June, 308-311, 2013.
- McEVOY, J.W. *et al.* 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: a Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guideline. **J Am Coll Cardiol**, 000; 2019.
- McEWEN, B.J. The Influence of Herbal Medicine on Platelet Function and Coagulation: a Narrative Review. **Semin Thromb Hemost**: 41: 300-314, 2015.

MIGNANI, S. *et al.* Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified? **Drug Discovery Today**. Vol 23, Num 3, Mar, 2018.

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**, Rio de Janeiro, p.1346-1358, 10 ago. 2011.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.629-661, 2016.

NOÉ, L. *et al.* Regulators of Platelet cAMP Levels: Clinical and Therapeutic Implications. **Curr Med Chem**, 17(26):2897:905, 2010.

NUMATA, A. *et al.* A Cytotoxic Principle of the Brown Alga *Sargassum tortile* and Structures of Chromenes. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1209-1213, 1992.

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.

O'BRIEN, J.R. Platelet aggregation. Part II: some results of a new method. **J Clin Pathol**. 15: 452-455, 1962.

ONISHI, A. *et al.* Heparin and Anticoagulation. **Front Biosci (Landmark Ed)**; 1 Jun; 21:1372-92, 2016.

OOI, C.H. *et al.* Physicochemical evaluation and in vitro hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite. **J Mater Sci Mater Med**, Mar; 30(4):44, 2019.

PATEL, S. *et al.* Aspirin and Clopidogrel Resistance in Indian Patients with Ischemic Stroke and its Associations with Gene Polymorphisms: a Pilot Study. **Ann Indian Acad Neurol**, Apr-Jun; 22(2): 147-152, 2019.

PEREIRA, R.C. *et al.* Marine Diterpenes: Molecular Modeling of Thrombin Inhibitors with Potential Biotechnological Application as an Antithrombotic. **Mar Drugs**. Mar 20;15(3), 2017.

PETERSON, E.D. *et al.* Comparative Effectiveness, Safety, and Costs of Rivaroxaban and Warfarin among Morbidly Obese Patients with Atrial Fibrillation. **Am Heart J**. Feb 20; 212:113-119, 2019.

PHILIPPUS, A. C., Investigação química e biológica de extratos de macroalgas da ANTÁRTICA com vistas de obtenção de novos fármacos. 2018 . Qualificação de doutorado. UFSC. Florianópolis, SC, 2018.

PIRMOHAMED, M. Warfarin: the End or the End of One Size Fits all Therapy? **J Pers Med**, 8 (22), 2018.

PRYZDIAL, E.L.G. *et al.* Blood Coagulation Dissected. **Transfus Apher Sci**. Aug;57(4):449-457, 2018.

RASLAN, Z.; ABURIMA, A.; NASEEM, K.M. The Spatiotemporal Regulation of cAMP Signaling in Blood Platelets-old Friends and New Players. **Front pharmacol**, 10 nov, 6:266, 2015.

REIS, C.V. *et al.* Avaliação de Coagulação, Fibrinólise e Proteína C em Pacientes de Risco e com Doenças Coronarianas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n.1, p. 7-13, 2003.

RIVERA, P. *et al.* New Plastoquinones from the Brown Alga *Desmarestia menziesii*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 68, 1990.

SHEN, J. *et al.* Coordination of Platelet Agonist Signaling During the Hemostatic Response *in vivo*. **Adv. Sangue**, 1(27):2767-2775, 2017.

SILVA, M.V.F. *et al.* Antiagregantes Plaquetários na Prevenção Primária e Secundária de Eventos Aterotrombóticos. **Arq Bras Cardiol**: 100(6): e78-e84, 2013.

SHOBHARANI, P. *et al.* Antioxidant and Anticoagulant Activity of Polyphenol and Polysaccharides from Fermented *Sargassum sp.* **Int. J. Biol. Macromol**, Abr, 65: 542-8, 2014.

SMOLENSKI, A. Novel Roles of cAMP/cGMP-dependet Signaling in Platelets. **J Thromb Haemost**, Feb; 10(2): 167-76, 2012.

SYRACUSE, S.M. Avaliação do Efeito de Compostos Isolados da Alga Marinha *Dictyopteris jolyana* Sobre a Agregação Plaquetária. 98p. Dissertação (Mestrado). UFSC. Florianópolis, SC, 2018.

TANTRY, U. S. *et al.* Acetylsaliylic Acid and Clopidogrel Hyporespossiveness Following Acute Coronary Syndromes. **Kardiologia Polska**, 76 (8): 1312-1319, 2018.

THOMAS, M.R.; STOREY, R.F. The Role of Platelets in Inflammation. **Thromb Haemost**; 1114: 449–458, 2015.

VEBER, D.F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem**, Jun (6); 45 (12):2615-23, 2002.

VERSTEEG, H. H. *et al.* New Fundamentals in Hemostasis. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 327-58, Jan 2013.

VILANOVA, E. *et al.* Update on Brazilian Biosimilar Enoxaparins. **Expert Ver Hematol**, 9(11):1015-1021, 2016.

XU, S.; HUANG, X.; CHEONG, K. Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure and Activities. **Mar. Drugs**; 15, 388, 2017.

ZHANG, Z. *et al.* Screening of Complex Fucoidans from Four Brown Algae Species as Procoagulant Agents. **Carbohydrate Polymers**, 115: 677-685, 2015.

ZHU, Z. *et al.* Higher Specificity of the Activity of Low Molecular Weight Fucoidan for Thrombin-induced Platelet Aggregation. **Thrombosis Research**, 125: 419-426, 2010.

ZATELLI, G.A., Investigação fitoqu mica e biológica de Eugenia Hiemalis Cambess des (Myrtaceae). 2015. 217p. Disserta o (Mestrado). UFSC. Florianópolis, SC, 2015.

YIP, C. *et al.* Platelets from Children are Hyper-responsive to Activation by Thrombin Receptor Activator Peptide and Adenosine Diphosphate Compared to Platelets from Adults. **British Journal of Haematology**, Feb, 168(4):526-532, 2015.

WALTENBERGER, B. *et al.* Natural Products to Counteract the Epidemic of Cardiovascular and Metabolic Disorders. **Molecules**, 21, 807, 2016.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Acessado em 05 março 2019).

WILSON, L.S. *et al.* Compartmentation and Compartment-specific Regulation of PDE5 by Protein Kinase G Allows Selective cGMP-mediated Regulation of Platelet Functions. **Proc Natl Acad Sci USA**, Sep 9; 105 (36): 13650-5, 2008.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa 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 a 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 Rector João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-0696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 021.201

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 metodologicamente para ser executado na prática

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os documentos para submissão e avaliação no CEPGH 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 CEPGH/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:

Concluiu 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: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 024.201

texto as informações sugeridas pelo relator.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANÓPOLIS, 14 de Outubro de 2014

Assinado por:

Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-0606 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br