



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

Tanara Arenhart

Avaliação do efeito *in vitro* de compostos isolados de algas marinhas pardas sobre a hemostasia humana

FLORIANÓPOLIS

2020

Tanara Arenhart

Avaliação do efeito *in vitro* de compostos isolados de algas marinhas pardas sobre a hemostasia humana

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na Área de Concentração Fármaco-Medicamentos
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Rabello de Moraes

Florianópolis

2020

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

Arenhart, Tanara

Avaliação do efeito in vitro de compostos isolados de algas marinhas pardas sobre a hemostasia humana / Tanara Arenhart ; orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes, 2020.

107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Hemostasia. 3. Algas pardas. 4. Antiagregante. 5. Stypoldiona. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Tanara Arenhart

Avaliação do efeito *in vitro* de compostos isolados de algas marinhas pardas sobre a hemostasia humana

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

Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Iara Fabrícia Kretzer
Universidade Federal de Santa Catarina

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.

Profa. Dra. Elenara Lemos-Senna
Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes
Orientadora

Florianópolis, 02 de Março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças nos momentos difíceis e por ter proporcionado encontros com pessoas maravilhosas nessa caminhada que eu escolhi percorrer.

À minha família: Sérgio, Roberta e Tuany, pois sem o amor e o apoio incondicional de vocês eu não estaria aqui hoje. Agradeço imensamente por todos os momentos especiais que passamos em família. Eu devo tudo a vocês!

Ao Igor, por todo o companheirismo, carinho e compreensão, especialmente nos momentos de ausência. Obrigada por se preocupar comigo e por me fazer ainda mais feliz!

À minha orientadora, Professora Dr.^a Ana Carolina Rabello de Moraes, que nunca mediu esforços para me ajudar no que fosse preciso. Obrigada por transmitir o seu conhecimento de uma forma tão humana, empática e inspiradora!

Às minhas parceiras do grupo de Hemostasia: Bruna, Bianca, Stephanie, Carine e Nathalia, por vibrarem comigo com cada pequena conquista. Bruna, eu te agradeço imensamente por todo o apoio que me deu nesses dois anos, principalmente pelas trocas, conselhos e reflexões sobre a vida!

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, especialmente a Laura e a Lisandra, e à Professora Dr.^a Maria Cláudia Santos Silva pela disponibilidade em fornecer o laboratório para que os experimentos fossem realizados.

À Professora Dra. Miriam B. Falkenberg e doutora Gabriele A. Zatelli da UFSC e à Professora Dra. Winklet Gallimore e doutorando Sanjay C. Campbell da *University of the West Indies At Mona* por fornecer os compostos testados nesse trabalho. E à Professora Dra. Lilian S. C. Bernardes por me dar conselhos sobre a docagem molecular. A parceria de vocês foi fundamental para a realização da pesquisa!

À chefia e aos colaboradores do Banco de Sangue e do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago pela disponibilidade em coletar as amostras de sangue sempre com muito bom humor, fazendo com que a execução desse trabalho fosse 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 subsidiarem a realização deste trabalho.

*“A imaginação é mais importante que a ciência,
porque a ciência é limitada,
ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.*
(Albert Einstein)

RESUMO

Os eventos trombóticos representam um grave problema de saúde pública em âmbito global. Tais eventos podem ser prevenidos e tratados com fármacos antitrombóticos, entretanto, esses medicamentos possuem limitações de uso e efeitos adversos. Nesse contexto, a busca por novos agentes com propriedades antitrombóticas em produtos naturais representa uma área de interesse, e o ambiente marinho abrange uma série de organismos com moléculas bioativas que desempenham uma vasta gama de atividades farmacológicas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito dos compostos stypoldiona (**C01**) e fucosterol (**C02**), provenientes das algas marinhas *Styopodium zonale* e *Dictyopteris jolyana*, respectivamente, sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana. Os estudos *in silico* sugeriram que os compostos possuem boa biodisponibilidade oral e um perfil toxicológico adequado para posteriores ensaios *in vitro*. A atividade *in vitro* sobre a coagulação foi avaliada pelos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), enquanto o efeito sobre a agregação plaquetária foi avaliado pela agregação induzida por difosfato de adenosina (ADP), epinefrina ou colágeno. Previamente à realização de todos os ensaios, as amostras de plasma pobre ou rico em plaquetas foram incubadas por 5 minutos a 37 °C com os compostos (500 µM) ou com dimetilsulfóxido 0,5% (controle). O tratamento com **C01** prolongou significativamente o TP (CE₅₀ de 236,7 ± 1,26 µM), enquanto o **C02** não apresentou atividade anticoagulante promissora. Ambos os compostos inibiram de forma significativa a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados. O **C01** apresentou atividade antiagregante mais promissora que o **C02** e, dessa forma, optou-se por continuar os estudos apenas com ele. Pelo método de exclusão com Azul de *Trypan* 0,04%, a viabilidade plaquetária após o tratamento com **C01** foi de 95,1 ± 0,5%, demonstrando que o composto não foi tóxico para plaquetas humanas. As CI₅₀ do **C01** frente à agregação estimulada por ADP, epinefrina e colágeno foram de 20,44 ± 1,21 µM, 64,69 ± 3,32 µM e 67,34 ± 1,45 µM, respectivamente, e a atividade antiagregante não foi tempo-dependente. O teste de hemólise demonstrou que o **C01** foi ligeiramente hemolítico (5,1 ± 0,9% de hemólise) em concentrações até cinco vezes superiores à sua CI₅₀. Os perfis das curvas de agregação frente ao ADP indicaram que o composto foi capaz de inibir totalmente a segunda onda de agregação, o que sugere que ele possa interferir com a ativação plaquetária por meio da inibição da via de sinalização do receptor P2Y₁₂. O efeito do **C01** sobre a ativação plaquetária foi avaliado por meio da expressão membranar de GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e de P-selectina (CD62P) pelo método de citometria de fluxo, e foi verificado que o composto inibiu a expressão de PAC1 (84,4 ± 9,7%) e de CD62P (53,6 ± 7,6%), confirmando a hipótese de que **C01** interfere na fase de ativação plaquetária. Para compreender melhor o mecanismo de ação do composto, realizou-se a docagem molecular deste com a enzima PI3Kγ da via do P2Y₁₂. Verificou-se que o composto não foi capaz de se ligar ao principal aminoácido do sítio ativo da proteína, mas se ligou a outros aminoácidos da região de afinidade. A compilação dos resultados evidencia que o **C01** pode ser utilizado como um protótipo no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos, visto que apresentou significativa atividade antiagregante e não foi tóxico para células humanas.

Palavras-chave: hemostasia, antiagregante, anticoagulante, stypoldiona, alga parda

EVALUATION OF IN VITRO EFFECT OF COMPOUNDS ISOLATED FROM BROWN ALGAE ON HUMAN HAEMOSTASIS

Thrombotic events are a serious global public health problem. Such events can be prevented and treated with antithrombotic drugs; however, these drugs have many limitations and adverse effects. In this context, the search for new agents with antithrombotic properties in natural products is an area of interest, and the marine environment includes a lot of organisms with bioactive molecules that perform a wide range of pharmacological activities. Therefore, this work aimed to investigate the effect of stypoldione (**C01**) and fucosterol (**C02**), derived from the algae *Stypopodium zonale* and *Dictyopteris Jolyana*, respectively, on human platelet aggregation and blood coagulation. In silico studies have suggested that both compounds have good oral bioavailability and an appropriate toxicological profile for further in vitro assays. Coagulation activity was assessed by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) tests, while the effect on platelet aggregation was evaluated using adenosine diphosphate (ADP), epinephrine and collagen as agonists. Previously to all tests, platelet poor or rich plasma samples were incubated for 5 minutes at 37 °C with the compounds (500 µM) or with 0.5% dimethyl sulfoxide (control). Treatment with **C01** significantly prolonged PT (EC_{50} 236.7 ± 1.26 µM), while **C02** did not show significant anticoagulant activity. Both compounds significantly inhibited platelet aggregation induced by all tested agonists. **C01** presented a more promising antiaggregant activity than **C02** and, therefore, it was decided to continue the studies only with the first one. Assessed by the Trypan Blue exclusion method, platelet viability after treatment with **C01** was $95.1 \pm 0.5\%$, demonstrating that the compound was not toxic to human platelets. The IC_{50} of **C01** for ADP, epinephrine and collagen-induced aggregation were 20.44 ± 1.21 µM, 64.69 ± 3.32 µM and 67.34 ± 1.45 µM, respectively, and the antiplatelet activity was not time-dependent. The hemolysis test showed that **C01** was slightly hemolytic ($5.1 \pm 0.9\%$ hemolysis) at concentrations up to five times higher than its IC_{50} . The aggregation curve profiles with ADP indicate that the compound is capable of totally inhibiting the second aggregation wave, suggesting that it may interfere with platelet activation by inhibiting the $P2Y_{12}$ receptor signaling pathway. The effect of **C01** on platelet activation was assessed by membrane expression of activated GpIIb/IIIa (PAC-1) and P-selectin (CD62P) by flow cytometry method, and it was found that the compound inhibited PAC-1 ($84.4 \pm 9.7\%$) and CD62P expression ($53.6 \pm 7.6\%$), confirming the hypothesis that **C01** interferes with platelet activation. To better understand the mechanism of action of the compound, it was performed the molecular docking between stypoldione and the enzyme $PI3K\gamma$ from the $P2Y_{12}$ pathway. It was found that the compound was unable to bind to the major amino acid of the protein active site but bound to other amino acids in the affinity region. Briefly, the compilation of the results shows that stypoldione can be used as a prototype in the development of new antithrombotic drugs, as it showed significant antiplatelet activity and was not toxic to human cells.

Keywords: hemostasis. antiplatelet. anticoagulant. stypoldione. brown algae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura interna das plaquetas.....	24
Figura 2 – Interações receptor-ligante na fase de adesão plaquetária.....	27
Figura 3 – Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via Gq e tirosina quinase..	29
Figura 4 – Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via Gi.....	30
Figura 5 - Mecanismo de síntese do agonista TxA2.....	31
Figura 6 - Interações entre plaquetas adjacentes na etapa de agregação.....	34
Figura 7 – Representação esquemática da teoria clássica da cascata de coagulação sanguínea.....	35
Figura 8 – Representação esquemática do sistema fibrinolítico.....	38
Figura 9 – Estrutura química geral da stypoldiona.....	44
Figura 10 – Estrutura química geral do fucosterol.....	47
Figura 11 - Representação esquemática da curva de agregação plaquetária.....	54
Figura 12 - <i>Dot-plots</i> e histogramas representativos da análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo....	60
Figura 13 - Predição teórica da toxicidade dos Composto 01 e 02 , do AAS e da ticlopidina por meio do software Osiris.....	64
Figura 14 - Curva concentração-resposta do tempo de protrombina (TP) em função da concentração do Composto 01	66
Figura 15 - Efeito dos Compostos 01 e 02 sobre as curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP, epinefrina e colágeno.....	68
Figura 16 - Efeito do Composto 01 (500 µM) sobre a viabilidade de plaquetas humanas.....	69
Figura 17 - Curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP, epinefrina e colágeno em função da concentração do Composto 01	70
Figura 18 - Efeito hemolítico do Composto 01	72
Figura 19 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP com diferentes concentrações do Composto 01	73
Figura 20 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina com diferentes concentrações do Composto 01	74
Figura 21 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por colágeno com diferentes concentrações do Composto 01	75

Figura 22 - Efeito do Composto 01 na expressão membranar de GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e P-selectina (CD62P) em plaquetas estimulados por ADP.....	76
Figura 23 – Potenciais interações entre o sítio ativo da enzima PI3K γ e o inibidor GSK2126458.....	77
Figura 24 – Interações 2D e 3D entre o sítio ativo da enzima PI3K γ e o inibidor GDC-0941.....	78
Figura 25 – Interações 2D e 3D entre o sítio ativo da enzima PI3K γ e o Composto 01 ...	79

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de plaquetas viáveis.....	56
Equação 2 - Cálculo da taxa de hemólise.....	57
Equação 3 - Cálculo da porcentagem de inibição a partir da intensidade de fluorescência média (IFM).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos dos Compostos 01 e 02 , do AAS e da ticlopidina calculados utilizando-se o programa SwissADME.....	63
Tabela 2 - Efeito dos Compostos 01 e 02 sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	65
Tabela 3 - Efeito dos Compostos 01 e 02 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (10 μ M), epinefrina (5 μ g/mL) e colágeno (2 μ g/mL).....	67
Tabela 4 - Efeito antiagregante do Composto 01 (15,6 μ M) em relação a diferentes períodos de incubação (5 e 15 minutos).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AT	Antitrombina
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
CD	Cluster de diferenciação
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CEPSH	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
COL	Colágeno
COX1	Ciclooxigenase1
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Epinefrina
F	Fator
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
FT	Fator tecidual

FvW	Fator de von Willebrand
GC	Guanilato ciclase
GP	Glicoproteína
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
HU	Hospital Universitário
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IFM	Intensidade de fluorescência média
IP3	Trifosfato de inositol
ISI	Índice de sensibilidade internacional
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOEH	Laboratório de oncologia experimental e hemopatias
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
iNOS	Óxido nítrico sintetase indutível
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAI-1	Inibidor de ativador do plasminogênio-1
PAR	Receptor ativado por protease
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Proteína C
PDF	Produto de degradação de fibrina e fibrinogênio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKB/Akt	Proteína quinase B serina-treonina
PKC	Proteína quinase C

PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PM	Peso molecular
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSGL-1	Glicoproteína 1 ligante de P-selectina
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNI	Razão normalizada internacional
SCA	Sistema canalicular aberto
SIB	Instituto Suíço de Bioinformática
SSC	<i>Side scatter</i>
SUS	Sistema único de saúde
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TIH	Trombocitopenia induzida pela heparina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador do plasminogênio do tipo tecidual
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TxA2	Tromboxano A2
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
uPA	Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 HEMOSTASIA.....	22
3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA.....	23
3.2.1 Endotélio vascular.....	23
3.2.2 Plaquetas.....	23
3.2.3 Adesão plaquetária.....	26
3.2.4 Ativação plaquetária.....	27
3.2.5 Secreção plaquetária.....	32
3.2.6 Agregação plaquetária.....	33
3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA.....	34
3.3.1 Cascata de coagulação sanguínea.....	34
3.3.2 Inibidores fisiológicos da coagulação.....	36
3.4 FIBRINÓLISE.....	37
3.5 DOENÇAS TROMBÓTICAS E TRATAMENTO.....	39
3.6 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS.....	42
3.6.1 Stypoldiona.....	44
3.6.2 Fucoesterol.....	46
3.7 ENSAIOS <i>IN SILICO</i> PARA PREDIÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E TOXICOLÓGICOS DE COMPOSTOS.....	47
3.8 DOCAGEM MOLECULAR.....	48
4 METODOLOGIA E ASPECTOS ÉTICOS.....	49
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	49
4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DE AMOSTRAS.....	49
4.3 ISOLAMENTO DO COMPOSTO 01	49
4.4 ISOLAMENTO DO COMPOSTO 02	50
4.5 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS COMPOSTOS 01 E 02	51

4.6 TESTES DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	52
4.6.1 Determinação da CE₅₀ do composto com melhor atividade anticoagulante.....	52
4.7 TESTES DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	53
4.7.1 Avaliação da atividade antiagregante do composto frente ao tempo de incubação.....	55
4.7.2 Determinação da CI₅₀ do composto com melhor atividade antiagregante.....	55
4.8 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO COM MELHOR ATIVIDADE ANTIAGREGANTE SOBRE CÉLULAS HUMANAS.....	55
4.8.1 Avaliação da viabilidade plaquetária.....	55
4.8.2 Teste de hemólise.....	56
4.9 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA.....	58
4.10 ESTUDOS DE DOCAGEM MOLECULAR.....	61
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5 RESULTADOS.....	63
5.1 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS COMPOSTOS STYPOLDIONA (COMPOSTO 01) E FUCOSTEROL (COMPOSTO 02).....	63
5.2 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS 01 E 02 SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	64
5.2.1 Determinação da CE₅₀ do composto com melhor atividade anticoagulante.....	65
5.3 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS 01 E 02 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	66
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO COM MELHOR ATIVIDADE ANTIAGREGANTE SOBRE PLAQUETAS.....	68
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE FRENTE AO TEMPO DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO.....	69
5.5.1 Determinação da CI₅₀ do composto frente à agregação plaquetária estimulada por ADP, epinefrina e colágeno.....	69
5.5.2 Avaliação do efeito antiagregante do composto frente ao tempo de incubação...	70
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO SOBRE ERITRÓCITOS.....	71
5.7 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO FRENTE A	

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO.....	72
5.8 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA.....	75
5.9 ESTUDOS DE DOCAGEM MOLECULAR.....	76
6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÃO.....	91
8 PERSPECTIVAS.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos.....	106

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um mecanismo fisiológico essencial que envolve o equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Esse processo tem como função manter o sangue em um estado fluido na corrente sanguínea, cessar o sangramento após uma lesão vascular e restaurar a integridade do vaso (AUSTIN, 2017; JOBLING; EYRE, 2013).

Mecanismos celulares e moleculares interagem de forma simultânea para manter o equilíbrio hemostático. Quando há ruptura do endotélio vascular, ocorre uma interação entre esses processos, que incluem a vasoconstrição e formação de um plugue inicial de plaquetas (hemostasia primária), ativação dos fatores de coagulação para formar uma malha de fibrina (hemostasia secundária), e por fim, a fibrinólise. Qualquer desequilíbrio nesse processo altamente regulado pode resultar em eventos trombóticos ou complicações hemorrágicas (SIRA; EYRE, 2016).

A trombose consiste em um grupo de doenças que são desencadeadas por um desequilíbrio da hemostasia a favor dos mecanismos pró-coagulantes, resultando na formação de um coágulo no lúmen do vaso sanguíneo, o que compromete o seu fluxo e pode levar à isquemia e morte tecidual (SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015). Os trombos arteriais são ricos em plaquetas e se depositam nas laterais ou ao redor de placas ateroscleróticas rompidas. Os trombos venosos, por sua vez, são ricos em fibrina e eritrócitos, e podem se desenvolver em uma parede endotelial intacta. Dessa forma, a trombose arterial está relacionada ao infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC), enquanto a trombose venosa é a causa do tromboembolismo venoso (TEV), embolia pulmonar e síndromes coronarianas agudas (KROUPENOVA et al., 2017).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte em todo o mundo. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em âmbito global (OPAS/OMS, 2017). Além disso, aproximadamente 50% de todas as mortes associadas a neoplasias malignas são decorrentes de eventos tromboembólicos (KROUPENOVA et al., 2017). No Brasil, as mortes por doenças cardiovasculares seguem

a tendência mundial e configuram o mais grave problema de saúde pública, representando cerca de 30% dos óbitos (BRASIL, 2017).

As terapias antitrombóticas atuais incluem os antiplaquetários, como o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel, e os fármacos anticoagulantes, representados pelos varfarínicos (antagonistas da vitamina K), heparinas e inibidores diretos do fator Xa (FLATO et al., 2011). Porém, esses medicamentos estão associados a um início de ação lento, uma janela terapêutica estreita e múltiplas interações medicamentosas e alimentares, de modo que exigem necessidade de monitorização laboratorial, além de causar efeitos adversos, como sangramentos gastrointestinais e trombocitopenia. Portanto, ainda se faz necessário a busca por novos fármacos antitrombóticos mais seguros para serem administrados na prevenção e tratamento dos eventos tromboembólicos e suas consequências (BECATTINI; LIGNANI; AGNELLI, 2010).

Os produtos de origem natural têm sido utilizados há muito tempo como uma tradicional fonte medicinal e, ainda hoje, são considerados a mais promissora fonte de moléculas e/ou protótipos de fármacos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Nos últimos 50 anos, muitos produtos naturais de origem marinha foram descobertos, incluindo terpenos, alcaloides, polissacarídeos, peptídeos e esteroides. Os organismos marinhos sésseis, como as macroalgas, produzem uma grande variedade de metabólitos químicos para garantir sua sobrevivência em habitats hostis, apresentando uma grande diversidade em relação a sua estrutura, complexidade, composição molecular e propriedades biológicas (MARTINS et al., 2014).

Alguns dos metabólitos secundários provenientes de algas marinhas já demonstraram ter atividades farmacológicas, tais como: atividade antiviral (SOUZA et al., 2007), antiofídica (DOMINGOS et al., 2011), anti-inflamatória (CUMASHI et al., 2007), citotóxica (AZEVEDO et al., 2008) e anticoagulante (MOURA et al., 2014), o que evidencia o seu potencial como fonte de novos compostos com atividades biológicas. Além disso, um grande número de polissacarídeos sulfatados com efeitos antitrombóticos foram isolados de algas marinhas nos últimos anos (CAMARA et al., 2011; WIJESSEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

A alga parda *Styopodium zonale*, pertencente à ordem Dictyotales, tem sido reconhecida como uma rica fonte de diterpenos estruturalmente únicos e biologicamente ativos, e entre eles encontra-se a stypoldiona, que já demonstrou atuar em uma variedade de processos biológicos (O'BRIEN et al., 1986; SOARES et al., 2015). O

fucosterol é outro composto presente em algas pardas da ordem Dictyotales, como a *Dictyota ciliolata* e a *Dictyopteris jolyana*. Na literatura, já foram relatados diversos efeitos biológicos provenientes desse esterol e, no contexto da hemostasia, o composto já demonstrou possuir atividade fibrinolítica (ABDUL et al., 2016; SHIMONAKA et al., 1984). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos compostos stypoldiona e fucosterol, provenientes das algas marinhas *S. zonale* e *D. jolyana*, respectivamente, sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito dos compostos stypoldiona e fucosterol sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a predição da biodisponibilidade oral e toxicidade do composto stypoldiona (Composto **01**) e fucosterol (Composto **02**) utilizando modelos computacionais;
- Avaliar a ação dos Compostos **01** e **02** sobre o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa);
- Determinar a concentração efetiva 50% (CE₅₀) do composto com melhor atividade anticoagulante;
- Estudar o efeito dos Compostos **01** e **02** sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP), epinefrina e colágeno;
- Avaliar o efeito do composto com melhor atividade antiagregante sobre a viabilidade de plaquetas humanas provenientes de indivíduos saudáveis;
- Avaliar se a atividade do composto com melhor ação antiagregante é dependente do tempo de tratamento;
- Determinar a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do composto com melhor atividade antiagregante frente à agregação plaquetária estimulada por ADP, epinefrina e colágeno;
- Investigar a toxicidade do composto com melhor atividade antiagregante sobre eritrócitos humanos provenientes de indivíduos saudáveis;
- Avaliar como o tratamento com diferentes concentrações do composto com melhor atividade antiagregante atua sobre os perfis das curvas de agregação plaquetária;
- Verificar o efeito do composto com melhor atividade antiagregante sobre a ativação plaquetária por meio da avaliação da expressão membranar de GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e de P-selectina (CD62P);
- Realizar a docagem molecular do composto com melhor atividade antiagregante e a enzima PI3K γ .

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um mecanismo fisiológico essencial para a vida que envolve o equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Esse processo tem como função manter o sangue em um estado fluido na corrente sanguínea, cessar o sangramento após uma lesão vascular e restaurar a integridade do vaso (AUSTIN, 2017; JOBLING; EYRE, 2013).

Em condições fisiológicas, o sangue circula em estado fluido através dos vasos, pois o endotélio vascular atua como uma barreira física separando os componentes sanguíneos das estruturas subendoteliais reativas, além de produzir inibidores da coagulação e da agregação plaquetária. Porém, quando ocorre um dano vascular, a superfície subendotelial com propriedades altamente trombogênicas passa a ser exposta, e essa alteração para um estado pró-trombótico induz à vasoconstrição, adesão e ativação de plaquetas, ativação da coagulação e deposição de fibrina na parede do vaso. Após a regeneração do tecido, o coágulo de fibrina se dissolve e o fluxo sanguíneo é restaurado (AUSTIN, 2017; SIRA; EYRE, 2016).

Estudos indicam que esses processos ocorrem de forma simultânea e interligada, entretanto, o mecanismo hemostático pode ser didaticamente dividido em hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise. A hemostasia primária compreende a interação complexa das plaquetas com o endotélio vascular, o que culmina na formação de um plugue de plaquetas inicial que visa cessar a perda sanguínea. Posteriormente, na hemostasia secundária, ocorre a ativação da cascata de coagulação, que produz uma malha de fibrina responsável por estabilizar o tampão plaquetário, tornando-o mais resistente. A última fase, conhecida como fibrinólise, tem como função degradar a fibrina e dissolver o coágulo formado, controlando sua extensão e prevenindo complicações tromboembólicas (AUSTIN, 2017; SIRA; EYRE, 2016; VERSTEEG et al., 2013).

3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA

3.2.1 Endotélio vascular

O endotélio é composto por uma monocamada celular fina que, juntamente com a membrana basal, forma a íntima e reveste o interior dos vasos sanguíneos. Na hemostasia, ele atua como uma barreira física separando os componentes sanguíneos das estruturas subendoteliais reativas, mantém a fluidez do sangue, modula o tônus e a permeabilidade vascular e produz inibidores da coagulação e da agregação plaquetária (AUSTIN, 2017; SIRA; EYRE, 2016).

Em circunstâncias fisiológicas, a barreira vascular promove uma superfície não trombogênica devido à produção de inibidores da ativação plaquetária, como a prostaciclina e o óxido nítrico; inibidores da coagulação, como o heparan sulfato e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI); e ativadores da fibrinólise, como o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (tPA). Em contraste, a camada subendotelial é altamente trombogênica e contém colágeno, fator de von Willebrand (FvW), fibronectina e fator tecidual (FT). Quando o endotélio vascular é rompido, seja por trauma ou por inflamação, o FvW é liberado e o colágeno e o FT passam a ser expressos na superfície das células endoteliais. Essa alteração para um estado pró-trombótico resulta em uma sequência de processos hemostáticos, como a vasoconstrição, adesão e ativação de plaquetas, produção de trombina e ativação da coagulação. Além disso, as células endoteliais também regulam a fibrinólise por meio da síntese e liberação do tPA e do inibidor de ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) (JOBILING; EYRE, 2013; KAZMI; BOYCE; LWALEED, 2015; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

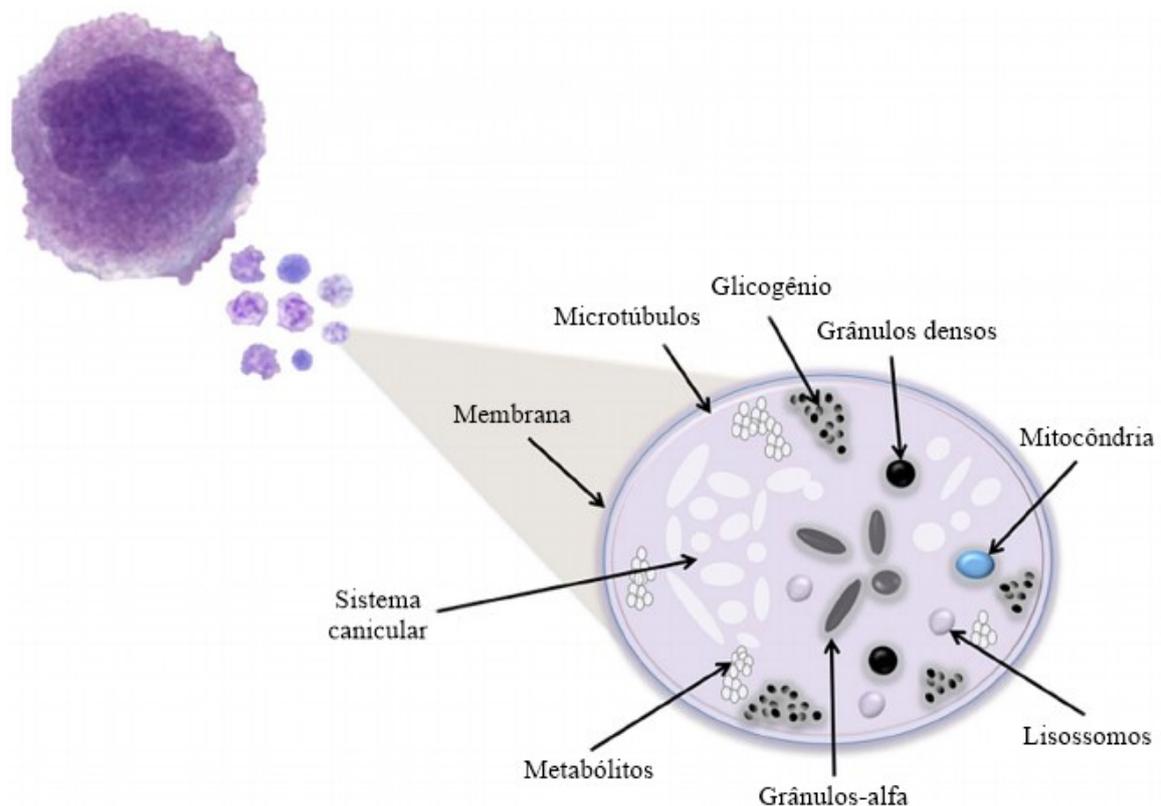
3.2.2 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos e anucleados derivados dos megacariócitos da medula óssea com 1,5 a 3,0 μm de diâmetro e formato discoide quando inativadas. Durante a maturação, os megacariócitos sofrem replicações do ácido desoxirribonucleico (DNA) sem divisão celular – processo conhecido como endomitose - levando à produção de megacariócitos poliplóides em resposta à trombopoietina. O abundante DNA genômico nos megacariócitos poliplóides aumenta sua capacidade de

sintetizar proteínas e empacotá-las em grânulos específicos de plaquetas. Dessa forma, os megacariócitos estendem longas protrusões e liberam pró-plaquetas na circulação sanguínea, que passam por uma divisão adicional e amadurecem. Em adultos saudáveis, existem normalmente de 150 a 400 bilhões de plaquetas por litro de sangue, e sua meia-vida varia entre oito e 14 dias na circulação sanguínea, sendo posteriormente eliminadas por meio das células reticuloendoteliais no baço e no fígado (BERNDT; METHAROM; ANDREWS, 2014; CIMMINO; GOLINO, 2013; WANG et al., 2012).

Apesar da ausência de núcleo, as plaquetas são células metabolicamente ativas, pois contêm retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndria, além de sintetizar certa quantidade de proteínas por meio do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) (QURESHI et al., 2009). A estrutura das plaquetas em repouso divide-se em três zonas: zona periférica, zona sol-gel e zona de organelas (Figura 1) (CASTRO et al., 2006; CIMMINO; GOLINO, 2013).

Figura 1 - Estrutura interna das plaquetas.



Fonte: adaptado de ZAPATA; COX; SALVATO, 2014.

A zona periférica é formada pelo glicocálix, citoesqueleto de actina e membrana plaquetária, sendo a última uma bicamada fosfolipídica rica em glicoproteínas (Gp) e receptores acoplados à proteína G (GPCR), que atuam nas fases de adesão e ativação plaquetária. Além da hemostasia primária, os fosfolipídios de membrana da plaqueta também são importantes para o processo de coagulação, visto que proporcionam a superfície sobre a qual agem alguns dos fatores da coagulação. A membrana pode conter os fatores de coagulação I, V, VIII, XI e XII absorvidos, além de receptores para trombina, ADP, FvW, colágeno, fibrinogênio, epinefrina, tromboxano A2 (TxA2) e serotonina (CASTRO et al., 2006; CIMMINO; GOLINO, 2013).

A zona sol-gel, por sua vez, abrange o sistema canalicular aberto (SCA) e o sistema tubular denso. O SCA é responsável pelo intercâmbio de moléculas com o compartimento externo, onde ocorre a liberação de diversas substâncias após a ativação plaquetária. Já no sistema tubular denso, encontra-se armazenado o cálcio (Ca^{+2}), que é essencial para desencadear os eventos contráteis, permitindo a alteração do formato discoide da plaqueta, o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares (CASTRO et al., 2006; CIMMINO; GOLINO, 2013; MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2017).

Em relação à zona de organelas, esta é composta pelos grânulos- α , grânulos densos e componentes celulares, como lisossomos e mitocôndria, que participam dos processos metabólicos da plaqueta e armazenam enzimas importantes para a função plaquetária (CASTRO et al., 2006; MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2017).

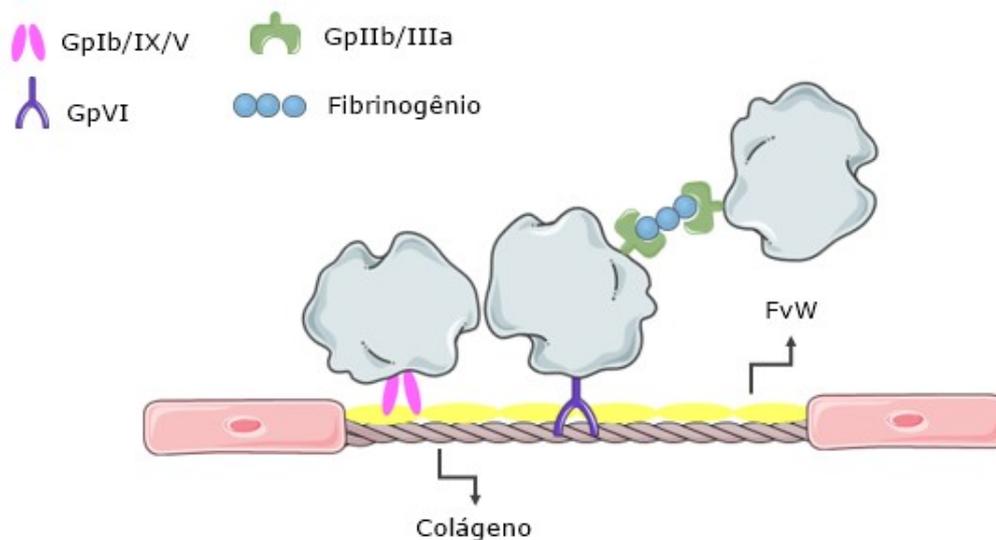
Como citado anteriormente, em circunstâncias fisiológicas, as plaquetas não interagem com a parede intacta do vaso. No entanto, após um trauma tecidual, as plaquetas aderem à matriz extracelular em um processo que envolve a ação coordenada de diferentes receptores plaquetários, dando origem a uma série de mecanismos bioquímicos e celulares que irão culminar na formação do trombo plaquetário. Classicamente, esses processos são divididos em quatro etapas: adesão, ativação, secreção e agregação (BROOS et al., 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013).

3.2.3 Adesão plaquetária

As plaquetas expressam diversos receptores de membrana que são importantes para sua função hemostática, como o complexo GpIb/V/IX, GpVI, GpIIb/IIIa, GpIa/IIa, receptores de trombina (receptores ativados por proteases - PARs), receptores de ADP (P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁), e receptores de TxA₂ (TP) (WANG; GALLANT; NI, 2016). A adesão inicial das plaquetas ao local da lesão vascular é mediada pela interação da GpIb, pertencente ao complexo GpIb/V/IX - uma glicoproteína estruturalmente complexa e expressa em megacariócitos e plaquetas -, com os domínios A1 e A3 do FvW, uma proteína adesiva multimérica que é liberada a partir da superfície subendotelial na presença de uma lesão (ANGIOLILLO; UENO; GOTO, 2010; CIMMINO; GOLINO, 2013).

Além do FvW, o colágeno também passa a ser expresso pelas células endoteliais e é capaz de interagir com diversas Gp de membrana, de forma direta ou indireta. A interação inicial é indireta e mediada pela interposição do FvW, que é capaz de se ligar ao colágeno e alterar a sua conformação da forma inativa para a forma ativa. Como consequência, o complexo GpIb/V/ IX interage com o FvW ativado e ligado ao colágeno, e essa interação, apesar de não estimular uma firme adesão plaquetária, reduz a velocidade das plaquetas e permite que se liguem diretamente ao colágeno através das GpVI e GpIa/IIa, glicoproteínas pertencentes a superfamília de imunoglobulinas. Essas interações ativam outros receptores, como a GpIIb/IIIa, que induz a uma ligação irreversível com o fibrinogênio (Figura 2) (GAWAS; VOGEL, 2013; LISMAN et al., 2006).

Figura 2 - Interações receptor-ligante na fase de adesão plaquetária.



Gp – glicoproteína; FvW – Fator de von Willebrand. Fonte: adaptado de GITZ et al., 2013.

A adesão das plaquetas aos componentes da matriz subendotelial desencadeia uma cascata de sinalização mediada por tirosina-quinases e receptores acoplados à proteína G, o que leva à ativação e liberação de grânulos plaquetários, e como consequência, recrutamento de plaquetas adicionais para o local da lesão. Portanto, a adesão representa uma etapa essencial para a formação do trombo plaquetário, visto que a ausência ou deficiência de glicoproteínas ou FvW causam defeitos expressivos na hemostasia (BROOS et al., 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013).

3.2.4 Ativação plaquetária

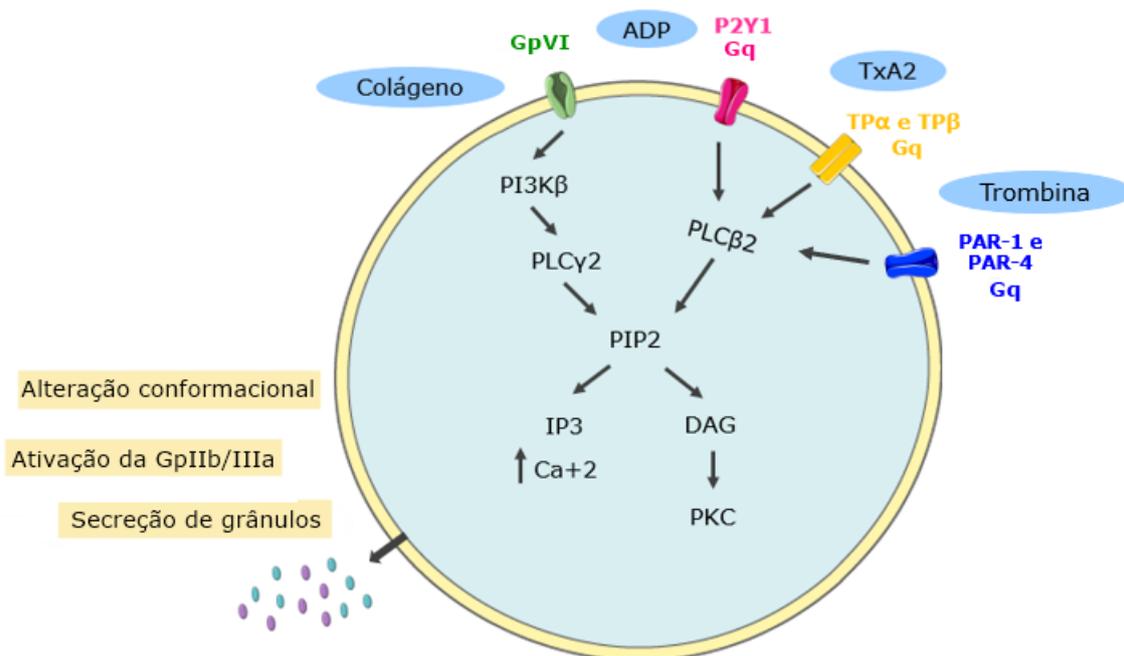
A ativação plaquetária pode ser iniciada por meio de uma série de vias metabólicas, ocorrendo após a interação de agonistas com seus respectivos receptores na membrana externa da plaqueta. Essas ligações resultam na ativação de vias comuns de sinalização intracelular, estimulando a liberação de agonistas a partir das plaquetas e gerando um *loop* de ativação. Os principais agonistas plaquetários são: o colágeno, o ADP, o TxA₂, a epinefrina e a trombina (ANGIOLILLO; UENO; GOTO, 2010).

Acredita-se que a GpVI seja o principal receptor de sinalização envolvido na ativação plaquetária a partir do colágeno exposto. A ligação do colágeno à GpVI desempenha um papel central na ativação plaquetária, pois é capaz de estimular o

fosfatidilinositol 3-quinase β (PI3K β), que ativa a fosfolipase C γ 2 (PLC γ 2). A PLC γ 2 catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4-bifosfato (PIP2), um fosfolípido de membrana, gerando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP3) (BROOS et al., 2011; BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016).

O IP3 se liga ao seu receptor no sistema tubular denso das plaquetas e estimula a liberação de Ca^{+2} a partir do retículo endoplasmático, o que aumenta a sua concentração intracelular e ativa o sistema contrátil actina-miosina, desencadeando modificações do citoesqueleto, alteração das plaquetas do formato discoide para o esférico, e extensão de pseudópodes. O DAG, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), levando à fosforilação de diversos substratos, o que resulta em uma série de eventos, incluindo a ativação da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), exposição da fosfatidilserina, secreção de grânulos, exposição da GpIIb/IIIa e, posteriormente, a agregação plaquetária (Figura 3). Além disso, a ativação da plaqueta pela ligação ao colágeno induz a liberação de agonistas como o ADP e o TxA2, ativando indiretamente a PLC β através da via Gq (BROOS et al., 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013; STALKER et al., 2012).

Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via Gq e tirosina quinase.



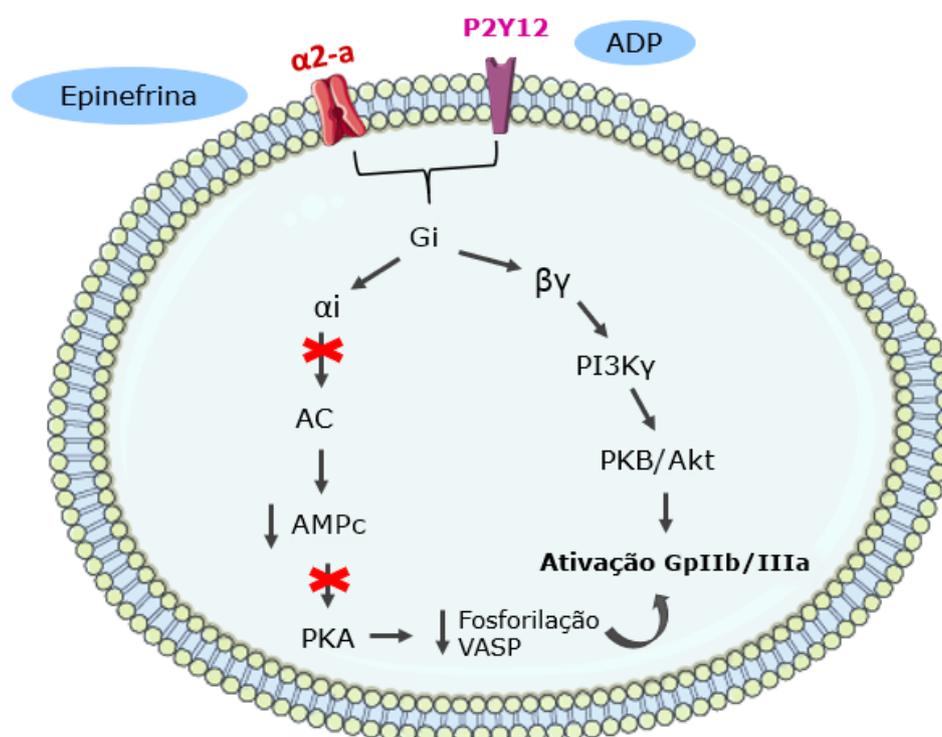
Gp – glicoproteína; TxA2 – tromboxano A2; ADP - difosfato de adenosina; PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase; PLC - fosfolipase C; PIP2 - fosfatidilinositol 4-bifosfato; DAG – diacilglicerol; IP3 - trifosfato de inositol; Ca^{+2} – cálcio; PKC - proteína quinase C. Fonte: adaptado de BROOS et al., 2011.

O ADP é um agonista solúvel armazenado em elevadas concentrações nos grânulos densos e é liberado pelas plaquetas aderentes durante a ativação plaquetária. O ADP interage com a superfície plaquetária por meio dos receptores P2X (ligados a canais iônicos) e P2Y (acoplados à proteína G). O receptor P2X₁ está associado a um rápido influxo de Ca^{+2} extracelular, o que é suficiente para induzir uma alteração conformacional na plaqueta, mas é incapaz de causar agregação, visto que a alteração é transitória. Já a ligação do ADP ao receptor P2Y₁, que é acoplado à proteína G_q, é capaz de ativar a PLCβ2. A PLCβ2, assim como a PLCγ2, hidrolisa o PIP2, dando origem ao DAG e ao IP3, que são responsáveis pelo aumento de Ca^{+2} intracelular e alterações conformacionais nas plaquetas, levando a uma fraca e transitória agregação (Figura 3) (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; BRASS et al., 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013).

O ADP também se liga ao receptor P2Y₁₂, que é acoplado à proteína G_i, assim como os receptores α₂-adrenérgicos da epinefrina. Estas ligações liberam as subunidades α_i e βγ da proteína G_i, o que leva à estabilização da agregação plaquetária. A subunidade α_i inibe a adenilato ciclase (AC) e, como consequência, diminui as concentrações de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e impede a ativação da

proteína quinase A (PKA), o que reduz a fosforilação de proteínas mediadas pelo AMPc, como a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), e altera a conformação da GpIIb/IIIa, tornando-a receptor para o fibrinogênio. Já a subunidade $\beta\gamma$ estimula a PI3K γ , que regula a ativação da GpIIb/IIIa através de um mecanismo dependente de lipídeos, envolvendo a proteína quinase B serina-treonina (PKB/Akt) (Figura 4). A coativação dos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ é essencial para a agregação induzida por ADP, uma vez que a inibição de qualquer um destes receptores resulta em uma diminuição acentuada na agregação (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; JIN; KUNAPULI, 1998).

Figura 4 - Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via Gi.

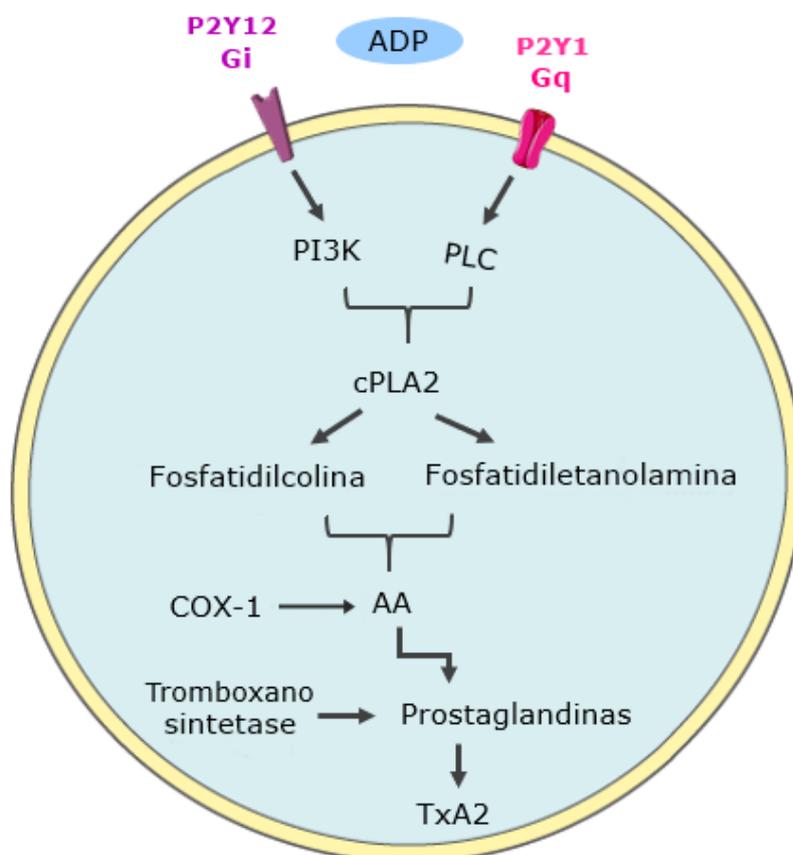


ADP - difosfato de adenosina; α 2-a - α 2-adrenérgicos; AC - adenilato ciclase; AMPc - adenosina monofosfato cíclico; PKA - proteína quinase A; PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase; PKB/Akt - proteína quinase B serina-treonina. Fonte: adaptado de BROOS et al., 2011.

A ativação pelo ADP também atua na amplificação da agregação induzida por agonistas mais potentes, como o TxA₂ e a trombina. Como consequência da ativação de PLC e PI3K e o aumento de Ca⁺² intraplaquetário, a cPLA₂ é estimulada a hidrolisar fosfolipídeos de membrana, como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, liberando

o ácido araquidônico (AA). A enzima cicloxigenase 1 (COX1) cliva o AA e dá origem aos endoperóxidos cíclicos, que desencadeiam a síntese de prostaglandinas. Por fim, a enzima tromboxano sintetase age sobre as prostaglandinas, realizando a síntese de TxA₂, que é liberado a partir de plaquetas aderentes (Figura 5). Quando secretado, o TxA₂ liga-se aos receptores TP α e TP β , que são acoplados à proteína G_q e ativam novamente a PLC β 2, desencadeando a cascata de sinalização anteriormente descrita, e atuando como um potente agregante plaquetário e vasoconstritor (BROOS et al., 2011; BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; STALKER et al., 2012).

Figura 5 - Mecanismo de síntese do agonista TxA₂.



TxA₂ – tromboxano A₂; ADP - difosfato de adenosina; PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase; PLC - fosfolipase C; cPLA2 – fosfolipase A2 citosólica; AA- ácido araquidônico. Fonte: adaptado de BROOS et al., 2011.

A trombina, por fim, é considerada o agonista mais potente e é liberada a partir dos grânulos- α das plaquetas ativadas. A trombina se liga às plaquetas por meio dos receptores ativados por proteases (PAR-1 e PAR-4) e essa ligação ativa a proteína G_q,

que estimula a PLC β 2. Devido à ativação de PLC β 2, o agonista fornece um forte estímulo para a hidrólise de fosfolípídeos de membrana, gerando mais TxA₂. O receptor PAR1 medeia a ativação plaquetária em baixas concentrações de trombina, enquanto o PAR4 requer uma concentração mais alta do agonista (Figura 3). Além disso, a trombina é responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, auxiliando na estabilização do trombo plaquetário (ANGILIOLO; UENO; GOTO, 2010; KAHN et al., 1999; YUN et al., 2016).

3.2.5 Secreção plaquetária

A ativação plaquetária está associada a alterações no citoesqueleto de actina, que ocorrem rapidamente após as plaquetas serem estimuladas, e resultam na formação de pseudópodes e aumento da área de superfície das plaquetas. A ativação do sistema contrátil actina-miosina promove a contração dos conteúdos granulares do citosol, provocando a sua fusão com a membrana externa, e levando à secreção e disseminação destes sobre a área do vaso danificado. Para que ocorra a disseminação, é necessária a ativação da PLC β ou PLC γ , a mobilização de Ca⁺² intracelular e a ativação da GpIIb/IIIa (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; JENNINGS, 2009).

As plaquetas contêm três tipos de grânulos: grânulos- α , grânulos densos e lisossomos, que armazenam mediadores fundamentais para a agregação plaquetária e cascata de coagulação. Os grânulos- α são os mais abundantes, existindo cerca de 50 a 80 grânulos- α por plaqueta. Os conteúdos granulares incluem glicoproteínas adesivas (P-selectina, fibrinogênio e FvW), fatores de coagulação (V, XI e XIII), quimiocinas e um estoque de GpIIb/IIIa. A liberação dessas proteínas potencializa a ligação de plaquetas via GpIIb/IIIa com o fibrinogênio e GpIb/IX/V com o FvW, reforçando as interações plaquetárias e recrutando mais plaquetas para o local da lesão (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013; THOMAS; STOREY, 2015; YUN et al., 2016).

A P-selectina, também conhecida como CD62P, exerce um papel central nas interações entre plaquetas, leucócitos e células endoteliais por meio de sua ligação com a glicoproteína 1 ligante de P-selectina (PSGL-1). Há relatos de que monócitos, neutrófilos e eosinófilos expressam PSGL-1, e sua interação com a P-selectina na superfície plaquetária é responsável por recrutar monócitos para o endotélio lesionado. Os leucócitos recrutados, por sua vez, contribuem para o aumento da ativação

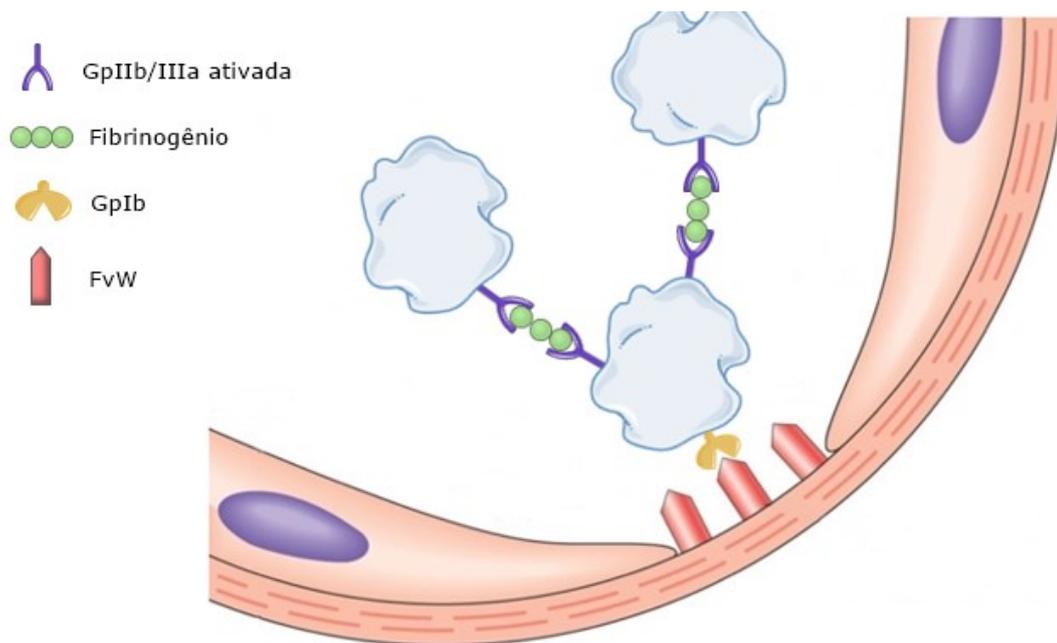
plaquetária e liberação de citocinas pró-inflamatórias (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013; JENNINGS, 2009).

Já os grânulos densos armazenam uma variedade de moléculas não proteicas que são secretadas durante a ativação plaquetária, como serotonina e histamina, ADP, trifosfato de adenosina (ATP), magnésio, Ca^{+2} e TxA2. A liberação de mediadores secundários, como os agonistas ADP e TxA2, é fundamental para o *feedback* positivo que leva à rápida ativação de um grande número de plaquetas e suporta a consolidação do trombo plaquetário. Por fim, os lisossomos contém glicosidases, proteases ácidas e hidrolases, cuja função é eliminar os agregados plaquetários circulantes (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; THOMAS; STOREY, 2015).

3.2.6 Agregação plaquetária

Os eventos de adesão e ativação culminam na agregação plaquetária, que é um processo dinâmico que envolve a ligação de proteínas adesivas ao receptor GpIIb/IIIa em sua forma ativa. As alterações conformacionais desse receptor, decorrentes da ativação plaquetária, aumentam sua afinidade pelas moléculas de fibrinogênio, que é secretado a partir dos grânulos- α . O fibrinogênio se liga à GpIIb/IIIa ativada, e essa ligação induz outras Gps adesivas, incluindo fibronectina, FvW e vitronectina a se ligarem nesses receptores, formando “pontes” entre as plaquetas adjacentes, o que contribui para a estabilização do plugue plaquetário e formação de um trombo rico em fibrinogênio no local da lesão (Figura 6) (CIMMINO; GOLINO, 2013; JENNINGS, 2009; MADAN; BERKOWITZ; TCHENG, 1998).

Figura 6 - Interações entre plaquetas adjacentes na etapa de agregação.



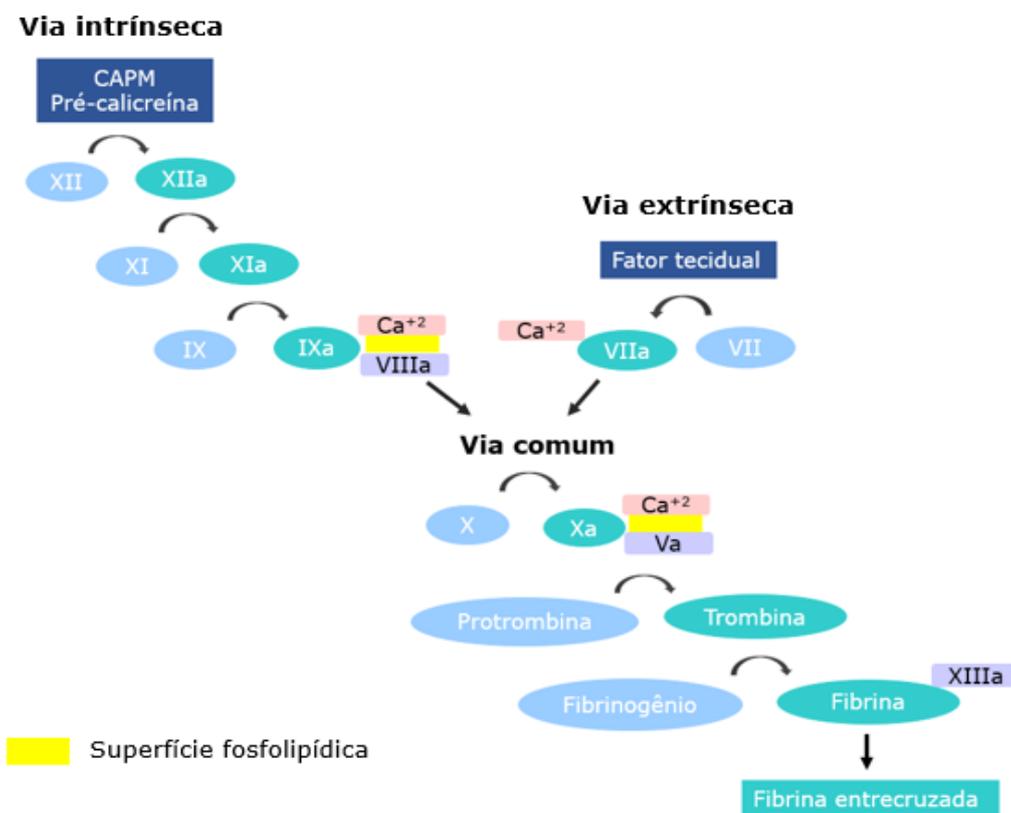
Gp – glicoproteína; FvW – Fator de von Willebrand. Fonte: adaptado de ROBBINS; COTRAN, 2010.

3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

3.3.1 Cascata de coagulação sanguínea

A formação do coágulo de fibrina no sítio da lesão endotelial envolve complexas interações entre substratos de zimogênios, proteases plasmáticas e cofatores. De forma sequencial, os zimogênios são ativados pelo produto da reação enzimática anterior e, por sua vez, ativam o zimogênio subsequente. Os mecanismos envolvidos nesse processo são regulados para contrapor-se à perda excessiva de sangue e, simultaneamente, evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes da produção excessiva de fibrina. Estudos recentes demonstram que o modelo da cascata de coagulação que melhor explica os eventos hemostáticos *in vivo* é o modelo baseado em superfícies celulares. Entretanto, a cascata de coagulação é tradicionalmente dividida em via intrínseca e extrínseca, que convergem em uma via comum (Figura 7). Apesar das limitações, a teoria clássica da coagulação é particularmente útil para a compreensão dos testes de coagulação *in vitro* (FERREIRA et al., 2010; FRANCO, 2001).

Figura 7 - Representação esquemática da teoria clássica da cascata de coagulação sanguínea.



CAPM – cinogênio de alto peso molecular; FT – fator tecidual. Fonte: adaptado de PALTA; SAROA; PALTA, 2014.

O processo de coagulação inicia-se principalmente pela ativação da via extrínseca ao ocorrer a exposição do FT na corrente sanguínea. O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente em células do músculo liso e fibroblastos. Em condições fisiológicas, o endotélio vascular minimiza o contato entre o FT e as proteínas pró-coagulantes, entretanto, após uma lesão vascular, o FT é exposto e interage com as proteínas plasmáticas. Em indivíduos saudáveis, cerca de 1% do fator VII (FVII) encontra-se em sua forma ativa (FVIIa) na circulação sanguínea. Dessa forma, o FVII e o FVIIa se ligam ao FT expresso em membranas celulares, formando o complexo FVIIa/FT, que possui atividade enzimática. Esse complexo, também conhecido como complexo tenase extrínseco, é capaz de clivar o fator X (FX) da via comum e o fator IX (FIX) da via intrínseca, tornando-os ativos e dando origem ao FXa e FIXa, respectivamente (FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

Já a via intrínseca é ativada pelo sistema de contato com superfícies de carga elétrica negativa, como o colágeno ou endotoxinas. O processo requer a presença de pré-caliceína (uma serinoprotease) e um cofator não enzimático denominado cininogênio de alto peso molecular (CAPM), que auxiliam na ativação do fator XII (FXII), formando o FXIIa. Em seguida, o FXIIa converte o fator XI (FXI) em fator XI ativado (FXIa), e o FXIa transforma o FIX em FIXa. O FIXa se liga então ao seu cofator VIII ativado (FVIIIa) formando o complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa) que, na presença de fosfolípídeos plaquetários e Ca^{+2} , é capaz de ativar o FX, dando origem ao FXa (FRANCO, 2001; SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015).

A ativação do FX, tanto pela via extrínseca quanto intrínseca, inicia a via comum. Nessa fase, o FXa associa-se ao seu cofator V ativado (FVa), formando o complexo protrombinase (FXa/FVa) na presença de fosfolípídeos de membrana e Ca^{+2} . Esse complexo converte a protrombina (FII) em trombina (FIIa), e a trombina cliva o fibrinogênio (FI) solúvel em polímeros de fibrina (FIa) solúveis e ativa o fator XIII (FXIIIa). Por fim, os polímeros de fibrina sofrem ação do complexo trombina/FXIIIa/ Ca^{+2} , gerando a fibrina entrecruzada e formando uma rede estável e insolúvel de fibrina sobre o trombo plaquetário (FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

Além da ação proteolítica sobre o fibrinogênio e o FXIII, a trombina também é responsável por ativar os cofatores V e VIII, dando origem ao FVa e FVIIIa. Como mencionado anteriormente, as reações envolvendo os cofatores são fundamentais para a geração do complexo tenase intrínseco, que converte o FX em FXa, e do complexo protrombinase, que converte a protrombina em trombina, e todas essas reações irão culminar na formação de um coágulo de fibrina estável e na ativação plaquetária (FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014; SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015).

3.3.2 Inibidores fisiológicos da coagulação

As reações bioquímicas do processo de coagulação devem ser estritamente reguladas com o intuito de evitar a ativação excessiva do sistema, produção inadequada de fibrina e oclusão vascular. Dessa forma, a atividade das proteases envolvidas na coagulação é regulada por várias proteínas inibitórias que atuam como anticoagulantes

naturais. Conforme mencionado anteriormente, o complexo FVIIa/FT é responsável por ativar o FIX e o FX, e essas reações são reguladas pelo TFPI, uma proteína produzida pelas células endoteliais. O TFPI se liga às proteases e forma o complexo quaternário FT/FVIIa/FXa/TFPI, inativando os fatores ativados e limitando a produção de FXa e a formação do coágulo (EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

Além do TFPI, a proteína C (PC) e proteína S (PS) também são de grande importância para a regulação do sistema. Após a ligação da trombina à trombosmodulina, a PC - uma glicoproteína dependente de vitamina K - se liga ao seu receptor presente no endotélio e se torna ativa. Uma vez ativada, a PCa promove a inativação e clivagem dos cofatores Va e VIIIa, processo que é potencializado pela PS, que atua como um cofator não enzimático nas reações de inativação (EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

A antitrombina (AT), por sua vez, é o inibidor primário da trombina que exerce efeito inibitório sobre outras serinoproteases, tais como o FIXa, FXa, FXIa e FXIIa. Além disso, a AT auxilia na dissociação do FVIIa/FT. A molécula de heparan sulfato, expressa na membrana das células endoteliais, e a heparina, um polissacarídeo estruturalmente similar ao heparan sulfato, aceleram as reações catalisadas pela AT. As diferentes vias regulatórias atuam de forma simultânea, pois há sinergismo entre o TFPI, a AT e o sistema da PC, evitando a produção excessiva de trombina (EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

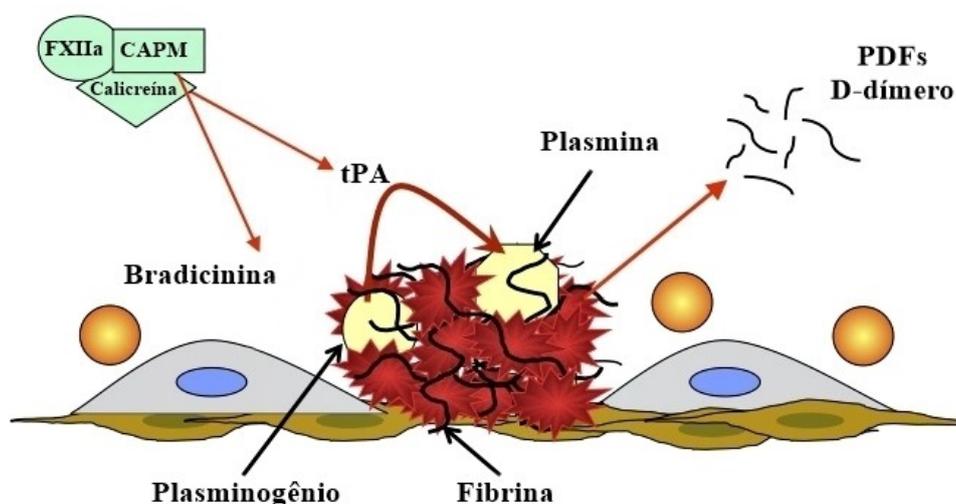
3.4 FIBRINÓLISE

O sistema fibrinolítico é ativado juntamente com a cascata de coagulação e é responsável por dissolver o coágulo formado, limitando sua extensão (Figura 8). Ao entrar em contato com partículas de carga elétrica negativa, o FXII é ativado e forma um complexo com o CAPM e a pré-caliceína, e esse complexo produz caliceína a partir de pré-caliceína e bradicinina. A bradicinina então estimula a liberação do tPA, óxido nítrico e prostaciclina a partir das células endoteliais. Além do tPA, o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA) também possui alta especificidade de ligação com seu substrato (CHAPIN; HAJJAR, 2015; EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001).

Posteriormente, o plasminogênio se liga aos resíduos de lisina da fibrina e os ativadores do plasminogênio (tPA, uPA e caliceína) clivam o plasminogênio em plasmina. A plasmina, por sua vez, é uma enzima lítica potente que tem a capacidade de degradar fibrinogênio e fibrina, liberando diferentes produtos de degradação (PDFs), além de degradar a fibrina entrecruzada, liberando fragmentos como o dímero-D. A capacidade da plasmina de lisar o coágulo depende diretamente da densidade e força da fibrina formada (CHAPIN; HAJJAR, 2015; EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001).

Esse sistema pode levar a consequências deletérias caso não seja devidamente regulado, portanto, a atividade fibrinolítica é limitada por inibidores de proteases. A inibição do sistema fibrinolítico ocorre principalmente pela ação do PAI-1, inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) e $\alpha 2$ -antiplasmina ($\alpha 2$ -AP). O PAI-1 é produzido pelos hepatócitos, plaquetas e células endoteliais e constitui o principal inibidor fisiológico do tPA. O TAFI, por sua vez, é ativado pela trombina e plasmina, sendo capaz de clivar os resíduos de lisina da molécula de fibrina, resultando em uma fraca ligação do plasminogênio à fibrina. A $\alpha 2$ -AP, por fim, é uma glicoproteína plasmática responsável por inibir a plasmina, limitando a sua produção e reduzindo a atividade proteolítica sobre a fibrina (CHAPIN; HAJJAR, 2015; EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001).

Figura 8 - Representação esquemática do sistema fibrinolítico.



FXIIa – fator XII ativado; CAPM - cininogênio de alto peso molecular; tPA – ativador do plasminogênio tecidual; PDFs – produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio. Fonte: adaptado de ECLINPATH, 2013.

3.5 DOENÇAS TROMBÓTICAS E TRATAMENTO

Vários mecanismos interagem de forma simultânea para manter o equilíbrio hemostático, no entanto, anormalidades genéticas ou adquiridas nos processos hemostáticos podem causar distúrbios hemorrágicos ou trombofílicos (KRIZ; RINGER; RINGER, 2009). A trombose é caracterizada pelo estado de hipercoagulabilidade do sangue e pode ocorrer na circulação arterial ou venosa, sendo que a trombose arterial é a causa de grande parte dos ataques cardíacos e cerca de 80% dos AVCs isquêmicos, enquanto a trombose venosa é responsável por desencadear o tromboembolismo venoso e a embolia pulmonar. Alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento dessas doenças, tais como: hipertensão, diabetes, tabagismo, obesidade, histórico familiar, gravidez, câncer, trauma e submissão a cirurgias (FLATO et al., 2011; KOUPENOVA et al., 2017; MACKMAN, 2008).

De acordo com a OPAS e a OMS, as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte em todo o mundo, sendo representadas principalmente pelas cardiopatias isquêmicas e os AVCs. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em âmbito global (OPAS/OMS, 2017). Além disso, aproximadamente 50% de todas as mortes associadas a neoplasias malignas são decorrentes de eventos tromboembólicos (KOUPENOVA et al., 2017).

No Brasil, as mortes por doenças cardiovasculares seguem a tendência mundial, pois representaram cerca de 30% dos óbitos no ano de 2016, totalizando 350.000 casos ao ano (BRASIL, 2017). No ano de 2015, a estimativa dos custos diretos do setor público com esse grupo de doenças em todo o país foi de R\$ 5.103.930.001,38, enquanto os custos indiretos, como os gastos da Previdência Social com aposentadorias e auxílio-doença por doenças cardiovasculares foi de R\$ 527.998.450,32, o que configura um grave problema de saúde pública devido ao alto gasto do SUS com medicamentos, internações e aposentadorias por invalidez (SIQUEIRA; SIQUEIRA-FILHO; LAND, 2017).

Em relação à fisiopatologia, sabe-se que a trombose arterial e a trombose venosa ocorrem por meio de diferentes mecanismos. O gatilho primário para a trombose arterial é a ruptura de uma placa aterosclerótica, que se desenvolve por meio do acúmulo de lipídios na parede da artéria. Quando ocorre a ruptura, as plaquetas são

rapidamente recrutadas através da interação de seus receptores com o colágeno e o FvW, formando um tampão hemostático primário no local da lesão. Após a adesão à parede do vaso, as plaquetas tornam-se ativas e liberam o conteúdo dos grânulos, o que promove ainda mais o recrutamento, ativação e agregação das plaquetas, resultando em um rápido crescimento do trombo plaquetário (KROUPENOVA et al., 2017; MACKMAN, 2008). Portanto, os antiplaquetários são os fármacos de escolha para prevenir e tratar os distúrbios aterotrombóticos. O AAS é o antiplaquetário mais utilizado e tem sido administrado clinicamente há mais de 40 anos. Ele atua inibindo a COX-1 de forma irreversível, sendo esta enzima necessária para a síntese de TxA₂, um potente ativador plaquetário. O AAS reduz significativamente a incidência de um primeiro IAM em indivíduos com risco de doenças cardiovasculares, além de reduzir o risco em pacientes que já tiveram um IAM primário. Entretanto, a terapia com AAS oferece riscos, podendo causar úlceras estomacais e hemorragias, o que limita seu uso (BERGER et al., 2006; CASTRO et al., 2006; KROUPENOVA et al., 2017).

Sequencialmente à ruptura das placas ateroscleróticas, pode ocorrer a ativação da cascata de coagulação, pois o FT está presente em elevadas concentrações nas placas ateroscleróticas. Além disso, o FT também pode ser liberado sem a ruptura de placas e sem a presença de lesão endotelial, por meio de processos inflamatórios. Quando expresso, o FT se liga ao FVIIa da via extrínseca e esse complexo desencadeia a clivagem proteolítica do FX e do FIX, ativando a cascata de coagulação e produzindo um trombo rico em fibrina, que pode se instalar na circulação venosa e desencadear distúrbios tromboembólicos (KROUPENOVA et al., 2017).

Os trombos, tanto arteriais quanto venosos, bloqueiam o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio nas artérias e/ou veias afetadas, o que leva à hipóxia e isquemia tecidual, resultando nas manifestações clínicas de doenças trombóticas (CASTRO et al., 2006; MACKMAN, 2008). O tromboembolismo venoso (TEV) ocorre mais frequentemente nas grandes veias das pernas, enquanto a embolia pulmonar, uma complicação da TEV, se desenvolve quando parte do trombo se rompe, transita e se aloja em uma artéria pulmonar, obstruindo o fluxo sanguíneo. Nesses casos, os fármacos de escolha são os anticoagulantes, como os antagonistas da vitamina K e as heparinas, que têm como alvo múltiplas proteases da cascata da coagulação (KROUPENOVA et al., 2017; MACKMAN, 2008; WEITZ; LINKINS, 2007).

A heparina é o principal anticoagulante utilizado na prevenção e tratamento das desordens tromboembólicas. O fármaco se liga à antitrombina e potencializa a capacidade da proteína de inibir diversas proteases, principalmente o FXa e a trombina. A heparina não fracionada, administrada por via parenteral, é utilizada nas cirurgias cardiovasculares e na prevenção de TEV. Apesar desse fármaco apresentar-se efetivo, algumas limitações restringem o seu uso, tais como: necessidade de monitorização laboratorial contínua, hemorragias e complicações trombóticas associadas à trombocitopenia induzida pela heparina (TIH). Nesse contexto, a heparina de baixo peso molecular (HBPM) foi desenvolvida a partir do fracionamento da heparina, a fim de melhorar o seu perfil farmacológico. De fato, a administração de HBPM resultou em menor incidência de sangramento, entretanto, o fármaco ainda apresenta risco de desenvolver TIH (CINES et al., 2007; FLATO et al., 2011; MACKMAN, 2008).

Os antagonistas da vitamina K, por sua vez, são administrados na terapia anticoagulante a longo prazo. Esses inibidores, introduzidos há mais de 50 anos, atuam inibindo a enzima epóxi redutase, o que impede a carboxilação da vitamina K, processo necessário para a produção de várias proteases, como o FVII, FIX, FX e protrombina. A varfarina é o antagonista da vitamina K mais comumente prescrito, porém, a incidência de hemorragias graves varia de 1 a 3% por ano entre os indivíduos tratados com varfarina. Além disso, o fármaco apresenta uma janela terapêutica estreita, importantes interações medicamentosas e alimentares, e necessidade de monitorização laboratorial, o que dificulta o seu uso (BECATTINI; LIGNANI; AGNELLI, 2010; FLATO et al., 2011).

Além dos efeitos adversos mencionados, os indivíduos podem apresentar resistência aos fármacos antitrombóticos, que é definida como a necessidade de doses acima do convencional para manter a anticoagulação (SPIESS, 2008). O mesmo fenômeno pode ocorrer com pacientes que fazem uso de AAS e, apesar de não existir uma definição consensual, considera-se resistência clínica ao AAS a ocorrência de eventos cardiovasculares em pacientes na vigência do tratamento, enquanto a resistência laboratorial é definida como a persistência da agregação plaquetária evidenciada por testes laboratoriais (AKAY et al., 2009; SHENKMAN et al., 2008). As causas dos eventos de resistência aos fármacos antitrombóticos não estão bem esclarecidas, porém, alguns fatores parecem estar envolvidos, tais como: mutações genéticas, interações

medicamentosas, interferência da dieta, e entre outros (CAI et al., 2016; TAN et al., 2013).

3.6 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Devido às dificuldades encontradas nos tratamentos da trombose arterial e venosa, e ao fato de que os estudos na área de hemostasia são escassos, a busca por novos compostos antitrombóticos que apresentem menos efeitos adversos é um alvo de investigação necessário para a comunidade científica. Nesse contexto, os produtos de origem natural têm sido utilizados há muito tempo como uma tradicional fonte medicinal e, ainda hoje, continuam a desempenhar um papel crucial em pesquisas na área da química, biologia e medicina (WANG; DONG; SHENG, 2019). Esses produtos apresentam várias vantagens quando comparados aos compostos não naturais, tais como: alta diversidade química, especificidade bioquímica, eficiência de ligação e propensão para interagir com alvos biológicos (MARTINS et al., 2014).

O oceano representa cerca de 70% da superfície terrestre e constitui mais de 90% do espaço habitável do planeta. Estima-se que 50 a 80% de toda a vida na terra reside no oceano, sendo este o habitat de 32 dos 33 filos conhecidos, dos quais 15 são exclusivamente marinhos (MARGULIS; CHAPMAN, 2009). Apesar de ser um habitat pouco explorado devido a limitações técnicas, mais de 20.000 produtos naturais foram descobertos no ambiente marinho nos últimos 50 anos, muitos deles provenientes de macrorganismos como algas, esponjas, corais e outros invertebrados (BLUNT et al., 2015). Atualmente, existem nove medicamentos derivados de organismos marinhos que foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para serem utilizados na clínica, como a citarabina e a vidarabina. Entretanto, o esperado é que esse número aumente, já que existem 28 medicamentos de origem marinha que estão atualmente em ensaios clínicos (ALVES et al., 2018).

Durante sua evolução, as macroalgas desenvolveram vários tipos de mecanismos de defesa, utilizando uma grande variedade de moléculas específicas e potentes que lhes permitiram sobreviver em um ambiente hostil, com condições extremas envolvendo diferentes graus de salinidade, pressão, temperatura e luz, além de ataques bacterianos, virais e fúngicos (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2007). Dessa forma, as algas marinhas representam uma potencial fonte de novos compostos naturais,

visto que possuem metabólitos secundários provenientes do sistema de defesa, como terpenoides, poliéteres, peptídeos e lipoproteínas, assim como macromoléculas envolvidas no desenvolvimento e diferenciação celular, como proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos (RUOCCO et al., 2016).

As algas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o tipo do material de reserva e os pigmentos celulares: grupo Chlorophyta (algas verdes), Ochrophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas), sendo os dois últimos de grande interesse químico (BLUNT et al., 2015). Entre eles, o grupo das algas pardas constitui o mais importante em termos de biomassa, sendo representado principalmente pelas ordens Dictyotales e Fucales (TEIXEIRA, 2013).

A ordem Dictyotales consiste na grande família Dictyotaceae, onde são conhecidos cerca de 20 gêneros. Os gêneros da ordem Dictyotales podem ser divididos em três grupos químicos, de acordo com a sua composição: grupo *Styopodium* (produtores de meroditerpenos, que são diterpenos unidos a fenóis e esteroides), grupo *Dictyopteris* (produtores de sesquiterpenos unidos ou não a fluoroglucinol, esteroides e substâncias com enxofre) e grupo *Dictyota* (produtores de diterpenos policíclicos e esteroides) (TEIXEIRA, 2013; VALLIM et al., 2005).

Já foi demonstrado que diversas moléculas bioativas de origem marinha e seus derivados sintéticos possuem atividades farmacológicas, e entre elas pode-se destacar a atividade antiviral (SOUZA et al., 2007), antiofídica (DOMINGOS et al., 2011), anti-inflamatória (CUMASHI et al., 2007) e citotóxica (AZEVEDO et al., 2008). Em relação à hemostasia, existem poucos estudos avaliando o efeito de extratos e compostos isolados de algas marinhas sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea. Entretanto, alguns estudos evidenciaram que polissacarídeos sulfatados e diterpenos isolados de algas marinhas apresentaram atividade antitrombótica, apesar do mecanismo de ação não estar totalmente esclarecido (COSTA et al., 2010; MOURA et al., 2014).

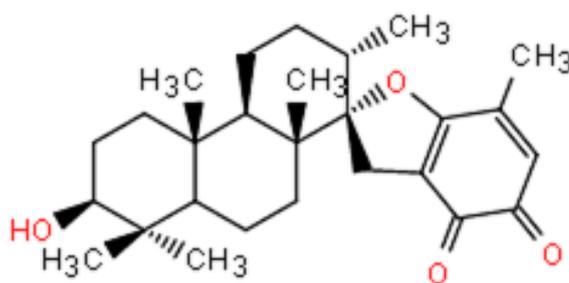
Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato bruto de *Canistrocarpus cervicornis* e compostos isolados de *Dictyopteris jolyana*, ambos da ordem Dictyotales, possuem um significativo efeito antiagregante (HINKE, 2016; SYRACUSE, 2018), o que levanta a hipótese de que outras algas pertencentes à mesma ordem, como as algas do gênero *Styopodium*, possam apresentar atividade semelhante.

3.6.1 Stypoldiona

As algas pardas do gênero *Styopodium* são encontradas em regiões tropicais e subtropicais, especialmente nos mares do Caribe Ocidental, sendo que a macroalga *Styopodium zonale* (J.V. Lamouroux) Papenfuss é a única espécie do gênero encontrada no litoral brasileiro. Essas algas constituem uma rica fonte de diterpenos estruturalmente únicos e biologicamente ativos de biogênese mista, denominados meroditerpenoides, que apresentam interessantes atividades farmacológicas, além de desempenhar um importante papel ecológico ao fornecer defesa química contra herbívoras (MENDES et al., 2011; SOARES et al., 2007).

Em 1979, o pesquisador Gerwick e seus colaboradores observaram que a alga *S. zonale* foi capaz de transformar a cor da água de aquários contendo peixes herbívoras da espécie *Eupomacentrus leucostictus* em cor de ferrugem, além de fazer com que os peixes tentassem pular para fora do aquário devido à falta de oxigênio, levando-os eventualmente à morte. Posteriormente, foi identificado que o responsável pela ictoxicidade era o composto stypoldiona, uma orto-quinona derivada da alga *S. zonale*, coletada nos mares de Belize (GERWICK et al., 1979; GERWICK; FENICAL, 1981). A estrutura química geral e o nome do composto segundo a IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) podem ser observadas na Figura 9.

Figura 9 - Estrutura química geral da stypoldiona.



Nome químico: (1S,2S,4aR,4bS,7S,8aR,10aR)-7-hidroxi-2,4b,7',8,8,10^a-hexametilespiro[2,3,4,4a,5,6,7,8a,9,10-decahidrofenantreno-1,2'-3H-1-benzofurano]-4',5'-diona. Fonte: A autora.

A partir de seu isolamento, a stypoldiona (Composto **01**) foi investigada e constatou-se que ela era capaz de inibir diversos processos biológicos e bioquímicos. O composto demonstrou ser um potente inibidor da divisão de embriões de ouriço-do-mar

de maneira dependente da concentração, além de inibir células de mamíferos cultivadas, células tumorais de Ehrlich e células de leucemia linfocítica em ratos (O'BRIEN et al., 1986; O'BRIEN et al., 1989; WHITE; JACOBS, 1983). Estudos evidenciaram que o composto também era capaz de inibir a polimerização de tubulina em microtúbulos de cérebro bovino *in vitro*, sugerindo que essa inibição poderia ser responsável pela capacidade do composto de inibir a divisão celular (O'BRIEN; JACOBS; WILSON, 1983). Apesar de ser tóxica para peixes, O'Brien e colaboradores constataram que uma dose de 100 mg/kg de stypoldiona não foi tóxica para ratos após 24 horas de tratamento (O'BRIEN et al., 1984).

A ampla gama de atividades inibitórias indicava que o composto poderia reagir com diferentes classes de receptores. Dessa forma, um estudo demonstrou que a stypoldiona reage covalentemente com grupos sulfidril de vários tipos de compostos contendo tiol, incluindo P-mercaptoetanol, cisteína, glutatona e proteínas como a tubulina. A partir do estudo, concluiu-se que o amplo espectro de atividades biológicas da stypoldiona poderia ocorrer devido a um mecanismo comum: ligação aos grupos sulfidrilas em sítios reativos das proteínas celulares e/ou ligação aos grupos sulfidril da glutatona, afetando a função de proteínas dependentes de sulfidril de forma indireta (O'BRIEN et al., 1986).

Outro estudo realizado em 1993 por Mayer e colaboradores evidenciou que a stypoldiona foi capaz de inibir 100% da fosfolipase A2 secretória (sPLA2) presente no veneno de abelhas a uma concentração de 3,7 μM (MAYER et al., 1993). Em relação à sPLA2, sabe-se que diferentes isoformas dessa enzima dependente de Ca^{+2} são expressas em células de mamíferos e estão presentes em leucócitos e plaquetas. A sPLA2 tem como função hidrolisar fosfolípidos de membrana, como a fosfatidilcolina, liberando ácidos graxos e lisofosfatidilcolina, que podem desencadear processos vasoativos, quimiotáticos e pró-inflamatórios, levando à aceleração da aterosclerose. Dessa forma, a inibição da atividade plasmática da sPLA2 é considerada um alvo viável para o tratamento de processos inflamatórios e doenças aterotrombóticas (MURAMAKI et al., 2011; QUACH; ARNOLD; CUMMINGS, 2014).

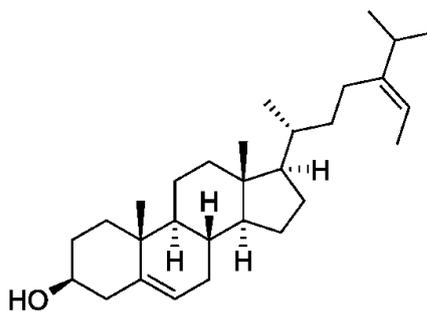
3.6.2 Fucosterol

O fucosterol (Composto **02**) é outro composto presente em algas pardas da ordem Dictyotales, como a *Dictyota ciliolata* Sonder ex Kützinger e a *Dictyopteris jolyana* E. C. Oliveira & R. P. Furtado, ambas encontradas em países da América do Sul (ABDUL et al., 2016). Na literatura, já foram relatados diversos efeitos biológicos provenientes desse esterol (KIM et al., 2009; LEE et al., 2003; JUNG et al., 2013).

Ao investigar a atividade antioxidante do fucosterol, Lee e colaboradores (2003) observaram que o tratamento com o composto foi capaz de diminuir as concentrações séricas de transaminases elevadas por dano hepático em ratos. Já Yoo e colaboradores (2012) observaram que o fucosterol inibiu a expressão de óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) ao regular sua transcrição. Além disso, o fucosterol também atenuou a fosforilação de proteínas da via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), demonstrando que o composto possui atividade anti-inflamatória. Em relação à atividade antiaterosclerótica, um estudo concluiu que o fucosterol proveniente de algas pardas era capaz de regular os genes responsáveis pela homeostase do colesterol e diminuir a concentração de lipídeos de uma forma concentração-dependente (JUNG et al., 2013).

No contexto da hemostasia, o composto já demonstrou possuir atividade fibrinolítica, visto que foi capaz de estimular a produção do ativador de plasminogênio do tipo tecidual e do tipo uroquinase em células endoteliais (ABDUL et al., 2016; SHIMONAKA et al., 1984). A estrutura química geral e o nome do composto segundo a IUPAC podem ser observados na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura química geral do fucosterol.



Nome químico: (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimetil-17-[(*E*,2*R*)-5-propan-2-ilhept-5-en-2-il]2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-ol. Fonte: A autora.

3.7 ENSAIOS *IN SILICO* PARA PREDIÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E TOXICOLÓGICOS DE COMPOSTOS

Atualmente, os estudos *in silico* para a predição de propriedades físico-químicas e toxicológicas têm ganhado cada vez mais destaque, sendo utilizados como um complemento aos estudos *in vitro* e *in vivo*. Para a predição da biodisponibilidade oral, aplica-se a regra dos cinco de Lipinski, que tem como objetivo estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados por via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um composto, uma vez que a previsão dos processos farmacocinéticos nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância para o desenvolvimento de um candidato a fármaco (LIPINSKI et al., 2001).

Segundo Lipinski, uma molécula candidata a fármaco possui boa biodisponibilidade oral quando apresenta 10 ou menos grupos aceptores de ligação hidrogênio (nO+N); cinco ou menos grupos doadores de ligação hidrogênio (nOH+NH); peso molecular (PM) inferior ou igual a 500 g/mol; e coeficiente de partição octanol-água (mLogP) inferior ou igual a 5,0 (LIPINSKI et al., 2001). Para complementar, as regras de Veber indicam que o número de ligações rotacionáveis da molécula deve ser inferior a 10, e a área de superfície polar deve ser inferior a 140 Å (VEBER et al., 2002). Ao violar mais de um desses parâmetros, é possível que existam desafios relacionados à absorção da molécula (LIPINSKI et al., 2001; MIGNANI et al., 2018).

Além disso, também é de suma importância predizer a toxicidade de compostos candidatos a fármacos, uma vez que as moléculas devem ser seguras e não devem induzir a efeitos adversos em seres humanos. Os modelos com animais são utilizados há muito tempo para testes de toxicidade, entretanto, os testes *in vivo* são limitados por fatores como o tempo, considerações éticas e encargos financeiros. Portanto, métodos computacionais que estimam a toxicidade de compostos químicos são considerados úteis, pois são capazes de prever a toxicidade, priorizar compostos químicos, orientar posteriores testes de toxicidade e minimizar falhas de estágio avançado no *design* de medicamentos (RAIES; BAJIC, 2016).

3.8 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular é uma ferramenta computacional utilizada para predizer a melhor orientação de ajuste de um ligante em uma proteína por meio do cálculo da energia de ligação (escore). Essa abordagem permite caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, tanto geometricamente quanto quimicamente, assim como elucidar suas interações moleculares. O *redocking*, por sua vez, consiste em avaliar se a docagem é capaz de prever com uma pequena margem de erro as interações previamente conhecidas entre uma proteína e seu ligante, com o intuito de estimar a qualidade da reprodução da pose de ligação por meio do valor de RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*), o que valida o método para testes posteriores (MENG et al., 2011).

No presente estudo, a docagem molecular foi realizada por meio do software *AutoDock Vina* 1.1.1, que é capaz de calcular as interações estéricas, hidrofóbicas e de hidrogênio entre o sítio ativo de uma determinada proteína e seu ligante com energia minimizada por meio do algoritmo genético lamarckiano. O software realiza a docagem do tipo rígido-flexível, onde a proteína permanece imóvel e o ligante possui flexibilidade, o que leva à busca conformacional por diferentes modos de ligação no sítio ativo do receptor e à avaliação da afinidade de cada uma das ligações usando uma função de escore. No *AutoDock Vina*, a interação é considerada estável quando o valor da energia de ligação é inferior a -7 Kcal/mol (TROTT; OLSON, 2010).

4 METODOLOGIA E ASPECTOS ÉTICOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina sob o parecer consubstanciado nº 831.351/2014 (Anexo A). O estudo foi desenvolvido de acordo com os requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos.

4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DE AMOSTRAS

Para a realização do estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico de doadores de sangue voluntários referenciados ao Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSEGRH). Primeiramente, os doadores considerados aptos para a doação foram questionados sobre a aceitação em participar da pesquisa, e foram informados sobre os objetivos, justificativa, procedimentos, riscos e benefícios do estudo. Após a concordância em participar, solicitou-se a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em seguida, foram coletados dois tubos de sangue contendo citrato de sódio a 3,2%. Para cada experimento, foram utilizadas amostras provenientes de pelo menos três voluntários. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), onde foram processadas conforme o experimento que seria realizado.

4.3 ISOLAMENTO DO COMPOSTO 01

O composto stypoldiona foi gentilmente cedido pelo doutorando Sanjay Cleveland Campbell sob orientação da Professora Dra. Winklet Gallimore do Departamento de Química da *University of the West Indies At Mona* localizado em Kingston – Jamaica, em parceria com a Professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg do Laboratório de Investigação de Produtos Naturais Marinhos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

A stypoldiona foi isolada a partir do extrato da alga parda *S. zonale*. Sucintamente, após a coleta do espécime, 220 g da alga seca foi extraída com 2000 mL de MeOH/DCM na proporção 1:1 e concentrada sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo. Como resultado, obteve-se 8,4 g de extrato com aspecto viscoso e coloração verde escura e, em seguida, o extrato foi submetido à cromatografia *flash* utilizando sílica gel e eluído em 200 mL de CH₂Cl₂ 100% (frações 1-18) e em 250 mL de CH₂Cl₂, aumentando as proporções de acetona (frações 19-40), seguido da eluição em 500 mL de metanol 100% (frações 41-45).

As frações foram separadas em dezesseis frações principais (Sz1-Sz16) com base nos perfis de TLC obtidos, e decidiu-se por prosseguir com a fração Sz10 em função do rendimento e do perfil cromatográfico. Dessa forma, 3,3 g do resíduo obtido a partir da fração Sz10 foi submetido à cromatografia em coluna com sílica gel e um sistema solvente de EtOAc-CH₂Cl₂ a 10%, resultando no isolamento de um composto com aspecto sólido e coloração avermelhada. Os dados foram então comparados com a literatura (GERWICK et al., 1979; GERWICK; FENICAL, 1981) e o composto foi identificado como uma orto-quinona, denominada stypoldiona.

O composto foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) na concentração estoque de 100 mM e armazenado em geladeira a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos, a solução estoque foi diluída em água destilada no mesmo dia de cada experimento e conforme o experimento que seria realizado. Em todos os experimentos, o DMSO 0,5% (concentração final) foi utilizado como controle negativo.

4.4 ISOLAMENTO DO COMPOSTO 02

O composto fucosterol, isolado a partir do extrato da alga parda *Dictyopteris jolyana* (DJI), foi gentilmente cedido pela doutora Gabriele Andressa Zatelli, sob orientação da Professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg do Laboratório de Investigação de Produtos Naturais Marinhos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

As frações resultantes de diversas colunas cromatográficas do extrato DJI foram reunidas (2,86 g) e submetidas ao fracionamento cromatográfico por meio de uma cromatografia líquida a vácuo em sílica gel 60, utilizando-se como fase móvel misturas

de n-hexano com proporções crescentes de acetato de etila. A fração 6 (409,8 mg) resultante desse procedimento foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta, utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de n-hexano com proporções crescentes de acetato de etila. A partir desse procedimento, obteve-se 67 frações, sendo que a fração J1C21-26-29 (94,5 mg) foi selecionada para posterior purificação, utilizando-se os mesmos parâmetros anteriores. Assim, obtiveram-se 47 frações, sendo que a fração J1C22-34-39 (15,8 mg) foi identificada como sendo o fucosterol.

O composto foi então dissolvido em DMSO na concentração estoque de 100 mM e armazenado em geladeira a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos, a solução estoque foi diluída em água destilada no mesmo dia de cada experimento de forma que a concentração final do composto fosse de 500 µM. Em todos os experimentos o DMSO 0,5% (concentração final) foi utilizado como controle negativo.

4.5 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS COMPOSTOS 01 E 02

A predição teórica da biodisponibilidade oral dos compostos foi realizada por meio da plataforma de acesso livre SwissADME, uma ferramenta gratuita desenvolvida pelo Grupo de Modelagem Molecular do SIB (Instituto Suíço de Bioinformática), que está disponibilizado *online* no site: <http://www.swissadme.ch/>. Por meio da ferramenta, foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski (2001) e Veber (2002): mLogP (MORIGUCHI et al., 1992), peso molecular (PM), número de aceptores de ligação de hidrogênio, número de doadores de ligação de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis e área de superfície polar. Além desses, também foi avaliado o escore de biodisponibilidade dos compostos.

Os ensaios de predição da toxicidade do composto foram realizados *in silico* utilizando-se o programa de domínio público *Osiris*[®] *Property Explorer* (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), em que foram avaliados quatro parâmetros teóricos de toxicidade: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução. Além do composto, também foi realizada a predição dos parâmetros físico-químicos e da toxicidade de dois fármacos antiplaquetários amplamente utilizados na prática clínica: o AAS e a ticlopidina.

4.6 TESTES DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Os testes de coagulação sanguínea foram realizados conforme descrito por Triplett, Harms e Koepke (1978), utilizando-se um coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer) e reagentes dos conjuntos diagnósticos TP Clot e TTPa Clot (BIOS Diagnóstica). Inicialmente, as amostras de sangue venoso foram centrifugadas a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C, e os plasmas obtidos a partir da centrifugação foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 15 mL, obtendo-se assim um *pool* de plasma pobre em plaquetas (PPP). Para a realização do TP, responsável por avaliar a via extrínseca da cascata de coagulação, 100 µL do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL dos compostos (500 µM) ou de DMSO 0,5% (controle negativo), e em seguida, foram adicionados 200 µL do reagente TP Clot. Já para a realização do TTPa, que avalia a via intrínseca da coagulação, adicionou-se 100 µL do reagente TTPa Clot na etapa de incubação do PPP com o composto ou DMSO e, após o tempo de incubação, foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

Além dos resultados em segundos, estes foram expressos de acordo com dois parâmetros de padronização internacional: a razão normalizada internacional (RNI) para o TP, que possui valores de referência entre 1,0 e 1,3, e a razão de TTPa, que pode variar entre 1,0 e 1,5 em indivíduos clinicamente saudáveis (SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2018).

4.6.1 Determinação da CE₅₀ do composto com melhor atividade anticoagulante

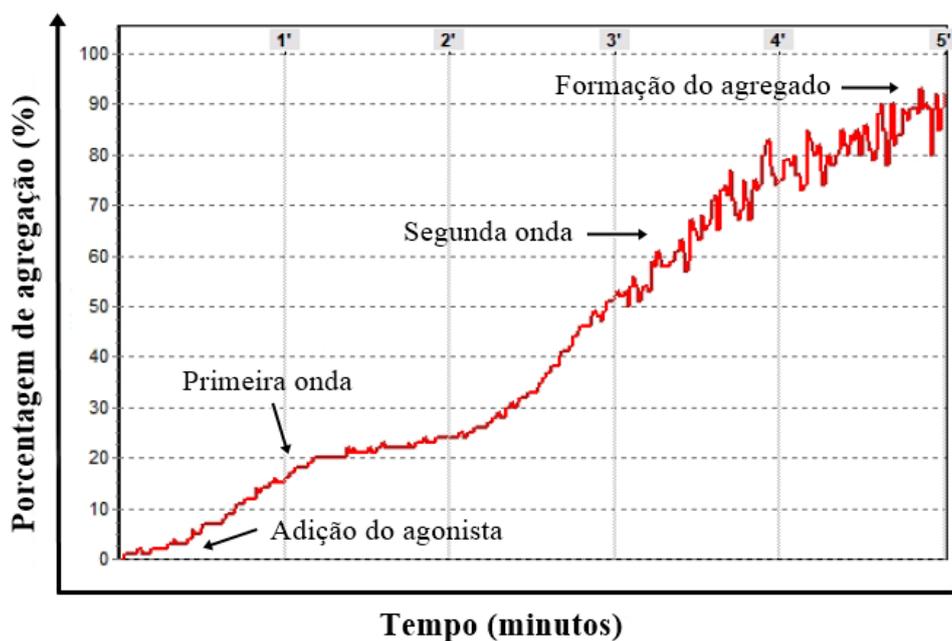
O composto que apresentou um prolongamento significativo dos tempos de TP ou TTPa teve a sua CE₅₀ determinada para aquele teste. A CE₅₀ consiste na concentração do composto que induz 50% do efeito máximo após um determinado período de exposição, e geralmente é utilizada para medir a potência de um fármaco (SEBAUGH, 2011). Para a determinação da CE₅₀, foram realizadas diluições seriadas do composto e o PPP foi tratado com as várias diluições (62,5, 125, 250 e 500 µM) ou com DMSO. Os ensaios de coagulação foram realizados conforme descrito no item 4.6. Para calcular a CE₅₀, utilizou-se a curva concentração-resposta do software GraphPad

Prism 5. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.7 TESTES DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação plaquetária foram executados de acordo com Born e Cross (1963), utilizando-se um agregômetro semi-automatizado (AgregGO, Qualitem). A agregação por turbidimetria baseia-se em um sistema fotométrico capaz de captar a alteração da transmitância de um plasma rico em plaquetas (PRP) sob agitação constante, adicionando-se um agente agregante, como o ADP, o AA ou o colágeno. Quando as plaquetas estão em suspensão, o plasma encontra-se turvo, o que dificulta a passagem de luz através do PRP. Entretanto, quando é adicionado um agonista, ocorre a formação de grumos plaquetários e o meio torna-se mais claro, facilitando a passagem de luz e aumentando a transmitância. Por meio dessa metodologia, é possível observar que a agregação possui uma resposta bifásica, composta pela fase de ativação plaquetária frente ao estímulo com o agonista, denominada agregação reversível ou primeira onda, seguida pela amplificação de sinal, liberação do conteúdo granular e agregação irreversível, o que resulta na segunda onda observada na curva de agregação plaquetária (Figura 11) (KOLTAI et al., 2017).

Figura 11 – Representação esquemática da curva de agregação plaquetária.



Fonte: A autora.

Para a realização dos experimentos, as amostras de sangue total foram centrifugadas a 123 g por 10 minutos em temperatura ambiente, e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 15 mL para a obtenção de um *pool* de PRP. Em seguida, as plaquetas do *pool* de PRP foram quantificadas. Para tanto, 50 μL do *pool* de PRP foram diluídos em 950 μL de oxalato de amônia 1% e a diluição foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, a câmara de Neubauer foi preenchida com a diluição e as plaquetas foram contadas. Após a contagem, o volume do *pool* de PRP foi ajustado com tampão fosfato-salino (PBS) de forma que a contagem de plaquetas ficasse próxima a 250.000 plaquetas/ mm^3 . Para avaliar o efeito dos compostos sobre a agregação plaquetária, 400 μL do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 μL dos compostos (500 μM), de ticlopidina 10 mM (controle positivo) ou de DMSO 0,5% (controle negativo). Posteriormente, as amostras foram estimuladas individualmente com 10 μL de ADP (10 μM ; Sigma-Aldrich®), 10 μL de epinefrina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Hipolabor) ou 5 μL de colágeno (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chrono-Log Corp.), e a agregação foi acompanhada por 5 minutos utilizando-se o software AgreGo. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, utilizou-se o PPP obtido por meio da centrifugação das amostras de sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura

de 8 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.7.1 Determinação da CI_{50} do composto com melhor atividade antiagregante

O composto que apresentou agregações inferiores a 50% para algum agonista teve sua CI_{50} determinada, sendo essa a concentração do composto capaz de induzir 50% da inibição máxima (SEBAUGH, 2011). Para a determinação da CI_{50} , foram realizadas diluições seriadas do composto, e o PRP foi tratado com as várias diluições (7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 e 500 μ M) ou com DMSO. A agregação foi realizada conforme descrito no item 4.7. Para calcular a CI_{50} , utilizou-se a curva concentração-resposta do software GraphPad Prism 5. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.7.2 Avaliação da atividade antiagregante do composto frente ao tempo de incubação

Posteriormente ensaios de agregação plaquetária foram realizados para avaliar se o efeito do composto com melhor atividade antiagregante era tempo-dependente. Para tanto, 400 μ L do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 e 15 minutos com 10 μ L do composto com melhor atividade antiagregante (15,6 μ M) ou de DMSO 0,5%. Logo após, as amostras foram estimuladas individualmente com 10 μ L de ADP (10 μ M), epinefrina (5 μ g/mL) ou colágeno (2 μ g/mL), e a agregação foi acompanhada por 5 minutos utilizando-se o software AgreGo.

4.8 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO COM MELHOR ATIVIDADE ANTIAGREGANTE SOBRE CÉLULAS HUMANAS

4.8.1 Avaliação da viabilidade plaquetária

Para avaliar o efeito do composto com melhor atividade antiagregante sobre a viabilidade plaquetária, realizou-se o método de exclusão do Azul de *Trypan*. Esse ensaio é amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de um determinado composto,

pois mensura a quantidade de células viáveis presentes em uma suspensão celular após a adição do corante, e baseia-se no princípio de que as células viáveis possuem membranas celulares intactas onde o Azul de *Trypan* não é capaz de penetrar, diferentemente das células mortas ou lesionadas, em que há perda de seletividade da membrana plasmática e o corante é absorvido em seu citoplasma, tornando as células azuis (AVELAR-FREITAS et al., 2014; TENNANT, 1964).

Para a realização do ensaio, 400 µL do *pool* de PRP foram incubados por 5 minutos com 10 µL do composto (500 µM) ou de DMSO 0,5% (controle negativo). Para o controle positivo de morte celular, utilizaram-se os reagentes *FIX & PERM* (Nordic Mubio®). Para tanto, em um tubo de ensaio, adicionou-se 100 µL de PRP e 100 µL de *FIX-A* e, após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a solução foi lavada com 1 mL de PBS e centrifugada a 264 g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 µL de *FIX-B* à solução, que foi novamente incubada por 15 minutos e lavada com PBS.

Após as incubações, foram misturados volumes iguais de PRP tratado e de Azul de *Trypan* 0,04% (Sigma-Aldrich®). Em seguida, a câmara de Neubauer foi preenchida com a diluição e o número de plaquetas viáveis e não viáveis foi determinado. A porcentagem de plaquetas viáveis na amostra teste e nos controles foi calculada utilizando-se a Equação 1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram considerados adequados os valores de viabilidade acima de 95% (TENNANT, 1964).

Equação 1 – Cálculo da porcentagem de plaquetas viáveis.

$$\text{Porcentagem de plaquetas viáveis (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{pv}}{\text{N}^{\circ} \text{tp}} \times 100$$

Nº pv – número de plaquetas viáveis; Nº tp – número total de plaquetas. Fonte: A autora.

4.8.2 Teste de hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado para avaliar a capacidade do composto de induzir a ruptura da membrana e, como consequência, a liberação de hemoglobina, em eritrócitos provenientes de indivíduos clinicamente saudáveis. Para a realização do teste, as amostras de sangue venoso dos voluntários foram centrifugadas a 264 g por 10

minutos, e o plasma foi retirado com o auxílio de uma pipeta *pasteur*. As hemácias de cada paciente foram transferidas para um tubo tipo Falcon de 15 mL, e as hemácias de cada tubo foram lavadas com PBS por três vezes para isolar os eritrócitos do restante do plasma.

Após as lavagens, preparou-se uma suspensão estoque de eritrócitos com salina, e a suspensão foi lida em espectrofotômetro (*Microwell Systems*, Organon Teknika®) em um comprimento de onda de 540 nm, de forma a se obterem valores de absorvância entre 1,8 e 2,2 nm. Posteriormente, foram diluídos 50 µL da suspensão de eritrócitos em 950 µL de solução salina em microtubos, e essas suspensões foram tratadas com o composto em sua CI_{50} (20,44 µM) e em concentrações até cinco vezes superiores à CI_{50} . Como controle positivo (100% de hemólise), utilizou-se 50 µL de suspensão estoque de eritrócitos com adição de 950 µL de água destilada, e como controle negativo (0% de hemólise) misturou-se 50 µL de suspensão estoque de eritrócitos com 950 µL de solução salina.

Cada microtubo foi incubado em termobloco a 37 °C por uma hora sob agitação de 100 g. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e 100 µL do sobrenadante foi retirado de cada microtubo e transferido para uma placa de Elisa. Para finalizar, a absorvância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A taxa de hemólise foi calculada de acordo com a densidade óptica de cada amostra teste e dos controles, baseando-se na quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante devido à lise dos eritrócitos (Equação 2). Markowicz-Piasecka e colaboradores (2018) relataram que valores de hemólise abaixo de 5% são considerados não hemolíticos, portanto, este foi o valor de referência utilizado para avaliar o efeito hemolítico do composto.

Equação 2 – Cálculo da taxa de hemólise.

$$\text{Taxa de Hemólise (\%)} = \frac{\text{Dot} - \text{Docn}}{\text{Docp} - \text{Docn}} \times 100$$

Dot – densidade óptica da amostra teste; Docn – densidade óptica do controle negativo; Docp – densidade óptica do controle positivo. Fonte: A autora.

4.9 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA

O efeito do composto com melhor atividade antiagregante sobre a ativação plaquetária foi avaliado pela metodologia de citometria de fluxo por meio da determinação da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado e de P-selectina, utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC (clone PAC-1; BD Biosciences) e anti-CD62P-PE (clone AK-4; BD Biosciences), respectivamente.

A ativação plaquetária desencadeia alterações conformacionais na GpIIb/IIIa liberada a partir dos grânulos- α , que passa a se ligar na sequência de aminoácidos arg – gly – asp (RGD) presente nas moléculas de fibrinogênio e FvW, e os anticorpos do tipo PAC1 reconhecem especificamente a conformação ativada dessa proteína (LANDI; MARQUES JÚNIOR, 2003). Após a ativação plaquetária, os grânulos- α também liberam P-selectina (CD62P), que passa a ser expressa na membrana plaquetária, sendo capaz de se ligar à PSGL-1 presente em leucócitos e recrutar estas células para o endotélio lesionado, o que contribui para o aumento da ativação plaquetária (JENNINGS, 2009; JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013). Os anticorpos anti-CD62P e anti-PAC1, quando utilizados em conjunto, são considerados excelentes marcadores da ativação plaquetária (LANDI; MARQUES JÚNIOR, 2003).

As plaquetas também foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD61-PerCP (clone PN IM 1758U; BD Biosciences), um marcador megacariocítico capaz de se ligar à forma inativa e ativa da GpIIIa presente em plaquetas, o que auxilia na sua identificação (DI MINNO et al., 2009). 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).

Para a marcação com os anticorpos, 400 μ L do *pool* de PRP foram incubados por 5 minutos com 10 μ L do composto em sua maior concentração (500 μ M) ou com DMSO em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram estimuladas com 10 μ L de ADP (10 μ M) e incubadas por mais 5 minutos, e então se adicionou os anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC (20 μ L), anti-CD62P-PE (5 μ L) e anti-CD61-PerCP (2 μ L), e as amostras foram reservadas durante 15 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 277 g por 5 minutos. Para finalizar, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi suspenso em 500

μL de PBS e analisado imediatamente no citômetro de fluxo. Paralelamente, um tubo contendo plaquetas sem a estimulação do agonista também foi marcado com todos os anticorpos monoclonais, para servir como um controle de autoativação.

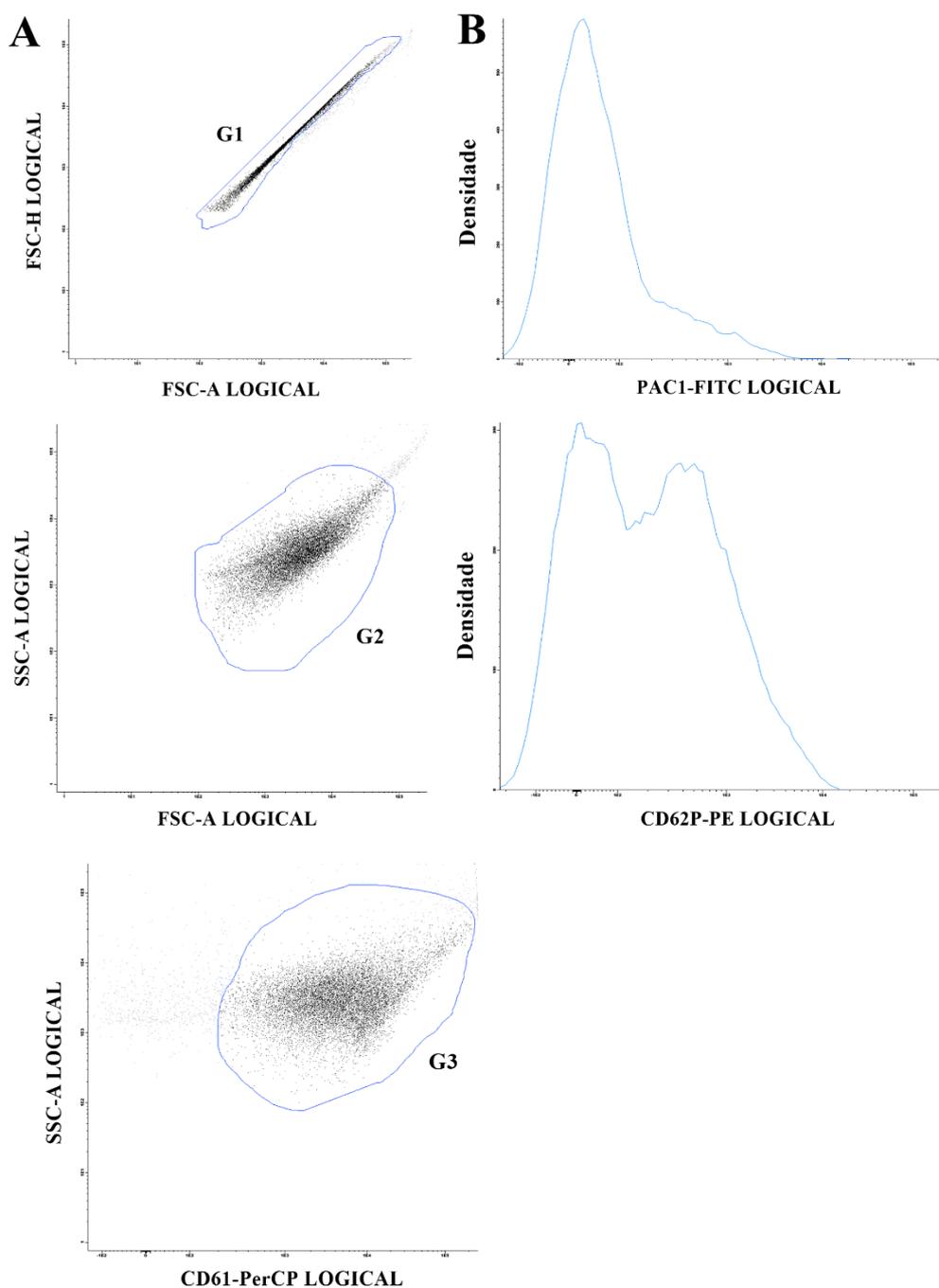
Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados no software *Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. A população de plaquetas foi identificada através dos parâmetros de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente) e pelas características de expressão de CD61/SSC, conforme ilustrado na Figura 12. Em cada tubo foram analisados 10.000 eventos positivos para CD61 na forma de histogramas e intensidade de fluorescência média (IFM). A IFM dos marcadores foi representada por meio da porcentagem de inibição, sendo calculada conforme a Equação 3 (BIRIS et al., 2003). Posteriormente, foi calculada a média e o desvio-padrão da porcentagem de inibição de experimentos isolados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Equação 3 – Cálculo da porcentagem de inibição a partir da intensidade de fluorescência média (IFM).

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

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

Figura 12 – *Dot-plots* e histogramas representativos da análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo.



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

4.10 ESTUDOS DE DOCAGEM MOLECULAR

No presente trabalho, realizou-se a docagem molecular da enzima PI3K γ com o Composto **01** por meio do notebook Dell Inspiron 14. Resumidamente, a estrutura cristalográfica da PI3K γ humana acoplada ao inibidor GDC-0941 foi obtida a partir do banco de dados *Protein Data Bank* – PDB (www.rcsb.org/pdb) com o código 3DBS e resolução de 2,8 Å, e em seguida, sua estrutura foi inserida no software *UCSF Chimera* 1.13.1 (PETTERSEN et al., 2004) para dar início ao *redocking*.

Para tanto, o software *UCSF Chimera* removeu os íons e moléculas de água e adicionou átomos de hidrogênio (H) à proteína, além de minimizar a sua estrutura utilizando as cargas de Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980). O inibidor GDC-0941 (FOLKES et al., 2008) foi então retirado da enzima e foi novamente construído no *UCSF Chimera*, minimizado utilizando as cargas de Gasteiger e inserido na proteína para realizar a docagem por meio do software *AutoDock Vina* 1.1.1 (TROTT; OLSON, 2010). Para avaliar as possíveis interações entre a PI3K γ e o inibidor GDC-0941, foi construída uma grade tridimensional no sítio ativo da enzima com as seguintes coordenadas: x = 22,5, y = 60,3, z = 19,8 e dimensões de 20x20x20 Å. Como resultado, foram obtidas as diferentes poses de ligação entre a proteína e o inibidor e seus respectivos RMSDs e escores.

Após validação, o Composto **01** foi construído com base em seu *smile* (PubChem CID: 3034636), minimizada utilizando as cargas de Gasteiger e inserida na proteína PI3K γ por meio do software *UCSF Chimera*. Posteriormente, foi construída uma grade tridimensional no sítio ativo da enzima utilizando o *AutoDock Vina*, com as mesmas coordenadas e dimensões definidas na docagem, obtendo como resultado as diferentes poses de ligação entre a proteína e o Composto **01**. Por fim, o software *Discovery Studio® Visualizer* 2019 (BIOVIA) foi utilizado para avaliar as interações proteína-ligante da pose de ligação com o melhor RMSD e escore.

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 foram comparadas

utilizando-se o teste t de *Student* para amostras independentes ou ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, de acordo com o número de grupos da variável qualitativa. Foi adotado um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS COMPOSTOS STYPOLDIONA (COMPOSTO **01**) E FUCOSTEROL (COMPOSTO **02**)

Os parâmetros físico-químicos dos Compostos **01** e **02**, AAS e ticlopidina foram calculados por meio da ferramenta *in silico* SwissADME (Tabela 1). Pela análise dos dados, verificou-se que o Composto **01** não violou nenhuma das regras propostas por Lipinski ou Veber, fato também observado para os medicamentos de referência. Já o Composto **02** violou a regra de mLogP, pois o valor calculado foi superior ao estabelecido por Lipinski. Além desses parâmetros, também foram avaliados os escores de biodisponibilidade dos Compostos **01** e **02** (probabilidade do fármaco de apresentar mais de 10% de biodisponibilidade oral), que foram de 0,56 e 0,55, respectivamente. Os escores foram similares aos apresentados pelos medicamentos AAS e ticlopidina, que também possuem escores de 0,56 e 0,55, respectivamente.

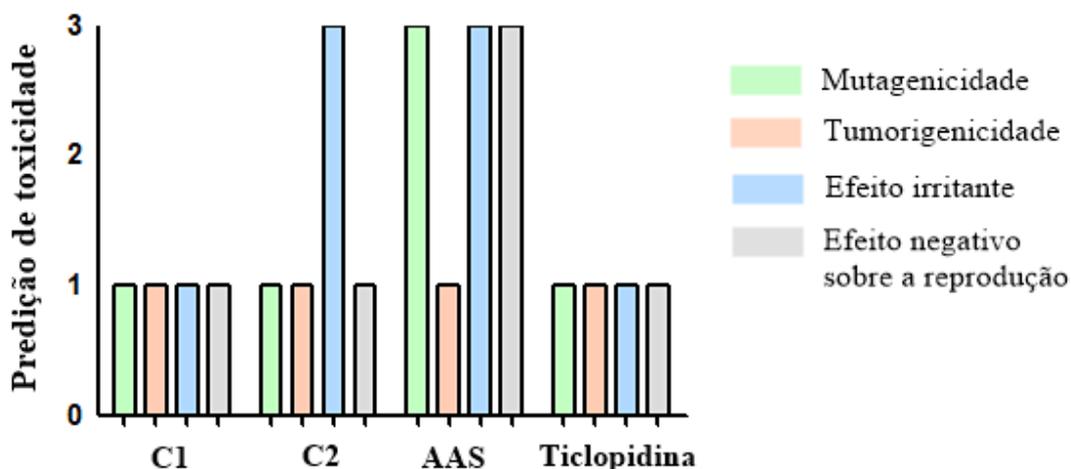
Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos dos Compostos **01** e **02**, do AAS e da ticlopidina calculados utilizando-se o programa SwissADME.

Parâmetro	Regra	Composto 01	Composto 02	AAS	Ticlopidina
mLogP	$\leq 5,0$	3,39	6,62	1,51	3,51
PM	< 500	426,59	412,69	180,16	263,79
nO + N	≤ 10	4	1	4	1
nOH + NH	≤ 5	1	1	1	0
N rotb	< 10	0	5	3	2
TPSA	$\leq 140 \text{ \AA}$	63,60	20,23	63,60	31,48
N° violações	≤ 1	0	1	0	0

Composto **01** – stypoldiona; Composto **02** – fucosterol; AAS – ácido acetilsalicílico; mLogP – predição de LogP (lipofilicidade); PM – peso molecular; nO+N – número de N e O aceptores de ligação de H; nOH+NH – número de NH e OH doadores de ligação de H; N rotb – número de ligações rotacionáveis; TPSA – área de superfície polar topológica; N° violações – número de violações. Fonte: A autora.

A predição teórica da toxicidade, realizada por meio do programa *Osiris*® *Property Explorer*, sugere que a estrutura do Composto **01** apresenta baixo risco de toxicidade para todos os parâmetros analisados: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritativos e efeito negativo sobre a reprodução. Da mesma forma, a ticlopidina apresentou baixo risco teórico de toxicidade para todos os parâmetros avaliados. No entanto, a estrutura do Composto **02** apresentou elevado risco de efeito irritante, enquanto o AAS apresentou elevado risco para todos os parâmetros analisados, exceto tumorigenicidade (Figura 13).

Figura 13 – Predição teórica da toxicidade dos Compostos **01** e **02**, do AAS e da ticlopidina por meio do software *Osiris*.



C1 - Composto **01** stypoldiona; C2 – Composto **02** fucosterol; AAS – ácido acetilsalicílico. Os riscos foram classificados em: 1 – baixo risco teórico de toxicidade; 2 – médio risco de toxicidade; 3 – alto risco teórico de toxicidade. Fonte: A autora.

5.2 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS **01** E **02** SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

No presente trabalho, avaliou-se o efeito dos Compostos **01** e **02** sobre o TP e o TTPa, que avaliam as vias extrínseca e intrínseca da coagulação sanguínea, respectivamente (Tabela 2). O Composto **01** (500 μ M) prolongou significativamente o TP ($P = 0,003$) e apresentou um RNI de 1,5, enquanto o Composto **02** não alterou o teste de forma significativa ($P = 0,064$) e apresentou um RNI de 1,1. Em relação ao TTPa, o

tratamento com o Composto **01** não alterou o teste ($P = 0,130$), enquanto o Composto **02** encurtou significativamente o TTPa ($P = 0,009$), apresentando valores de razão de TTPa inferiores ao controle.

Tabela 2 – Efeito dos Compostos **01** e **02** sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

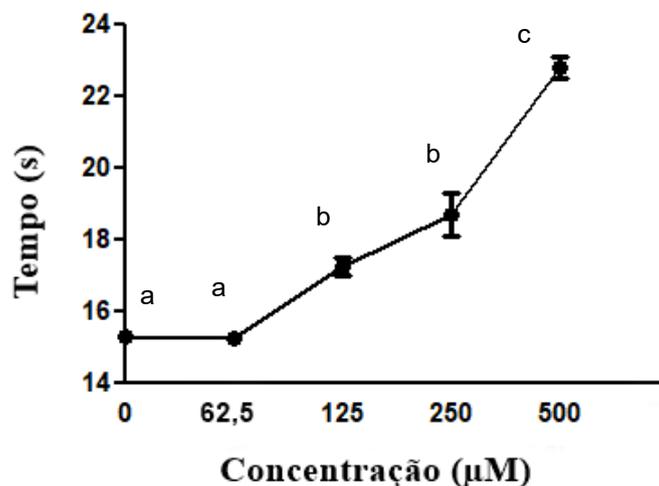
Tratamento	TP Média ± DP (s)	RNI	TTPa Média ± DP (s)	Razão TTPa
Controle (DMSO 0,5%)	13,2 ± 0,2	1,0	28,4 ± 0,2	1,0
Composto 01 (500 µM)	18,1 ± 0,3*	1,5	27,9 ± 0,1	0,9
Composto 02 (500 µM)	14,3 ± 0,4	1,1	23,0 ± 0,7*	0,8

DP – desvio padrão; DMSO – dimetilsulfóxido; Composto **01** – stypoldiona; Composto **02** – fucosterol. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (N = 3). *Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Teste t de *Student* para amostras independentes. Fonte: A autora.

5.2.1 Determinação da CE_{50} do composto com melhor atividade anticoagulante

Como o Composto **01** apresentou um prolongamento significativo do TP, avaliou-se se essa atividade era concentração-dependente. Para tanto, a sua CE_{50} foi calculada. Como se pode observar na Figura 14, a atividade sobre a via extrínseca da coagulação foi dependente da concentração, com uma CE_{50} de $236,7 \pm 1,26$ µM.

Figura 14 – Curva concentração-resposta do tempo de protrombina (TP) em função da concentração do Composto **01**.



Composto **01** – stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão ($N = 3$). Letras “a”, “b” e “c” – Os pontos identificados com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre si, pontos identificados com letras iguais não tiveram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. Fonte: A autora.

5.3 ATIVIDADE DOS COMPOSTOS **01** E **02** SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Além da atividade anticoagulante, avaliou-se o efeito dos compostos sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina e colágeno (Tabela 3). O Composto **01** (500 µM) inibiu significativamente a agregação induzida por ADP e epinefrina quando comparado ao controle negativo ($P < 0,0001$). Devido ao favorável efeito antiagregante apresentado pelo Composto **01**, avaliou-se se este seria capaz de alterar a agregação induzida por colágeno, e o composto também inibiu de forma significativa a agregação induzida por esse agonista quando comparado ao controle ($P < 0,0001$). Em relação ao Composto **02**, também houve uma diminuição significativa da agregação induzida por ADP e epinefrina na presença do composto (ADP – $P = 0,025$; Epinefrina – $P = 0,003$), porém, como as inibições foram menos promissoras na presença de agonistas considerados fracos, optou-se por não testar o efeito do composto frente à agregação estimulada por colágeno, que é um agonista mais potente. Como controle positivo, utilizou-se o antiplaquetário ticlopidina (10 mM), que é um inibidor irreversível dos receptores de ADP do tipo P2Y₁₂. Após o tratamento com o fármaco,

houve diminuições significativas da agregação plaquetária para todos os agonistas testados ($P < 0,0001$).

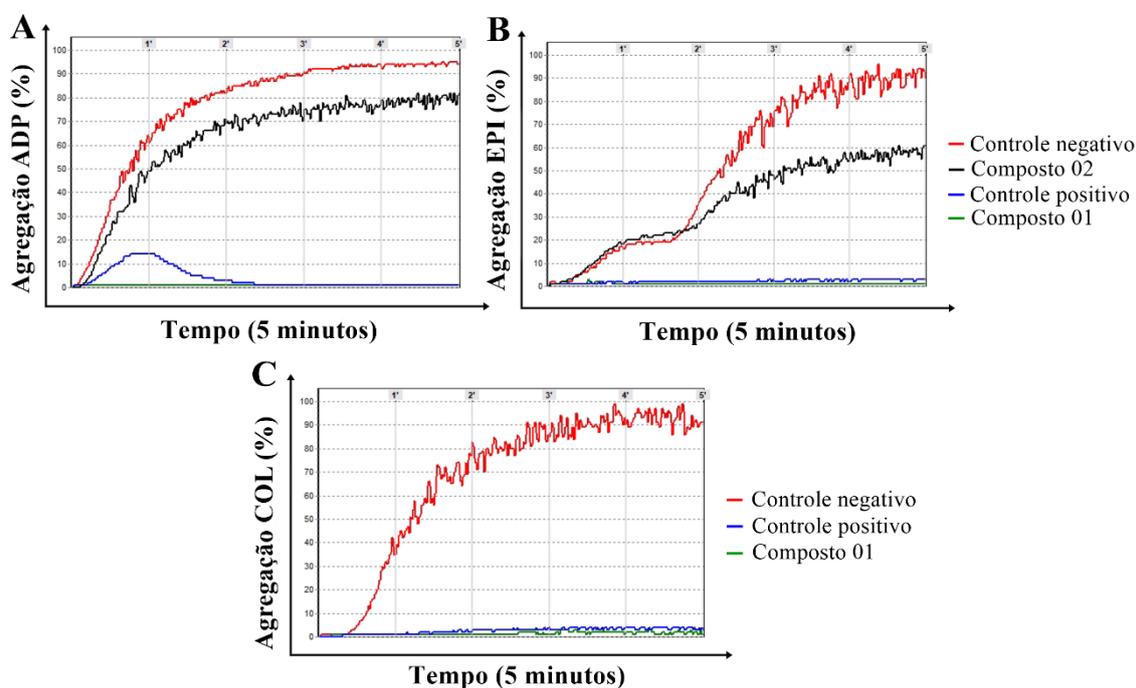
Tabela 3 – Efeito dos Compostos **01** e **02** sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (10 μ M), epinefrina (5 μ g/mL) e colágeno (2 μ g/mL).

Tratamento	ADP Média \pm DP (%)	Epinefrina Média \pm DP (%)	Colágeno Média \pm DP (%)
Controle negativo	94,0 \pm 4,0	89,6 \pm 4,0	91,0 \pm 3,0
Controle positivo	3,0 \pm 2,8*	2,0 \pm 1,4*	6,0 \pm 4,2*
Composto 01 (500 μM)	1,3 \pm 0,6*	1,6 \pm 1,2*	3,7 \pm 1,2*
Composto 02 (500 μM)	74,0 \pm 7,0*	58,0 \pm 2,8*	-

Controle negativo – DMSO 0,5%; Controle positivo – ticlopidina 10 mM; Composto **01** – stypoldiona; Composto **02** – fucosterol; ADP - difosfato de adenosina. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). *Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Teste t de *Student* para amostras independentes. Fonte: A autora.

Assim como o percentual de agregação, também foram avaliados os perfis das curvas de agregação após incubação com os Compostos **01** e **02**. Na Figura 15 estão apresentadas as imagens ilustrativas das curvas obtidas para os diferentes agonistas na presença dos compostos. Quando comparado às curvas do controle negativo, pode-se observar que o Composto **01** em sua maior concentração (500 μ M) foi capaz de inibir tanto a primeira quanto a segunda onda de agregação frente a todos os agonistas testados. Já o efeito inibitório do Composto **02** foi menos expressivo e parece estar associado à diminuição da amplificação da segunda onda de agregação quando estimulado pelos agonistas ADP e epinefrina.

Figura 15 – Efeito dos Compostos **01** e **02** sobre as curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP, epinefrina e colágeno.



Painel A: Agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP – 10 μ M). Painel B: Agregação plaquetária induzida por epinefrina (EPI – 5 μ g/mL). Painel C: Agregação plaquetária induzida por colágeno (COL – 2 μ g/mL). As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Controle negativo – DMSO 0,5 %; Controle positivo – ticlopidina (10 mM); Composto **01** – stypoldiona (500 μ M); Composto **02** – fucosterol (500 μ M). Fonte: A autora.

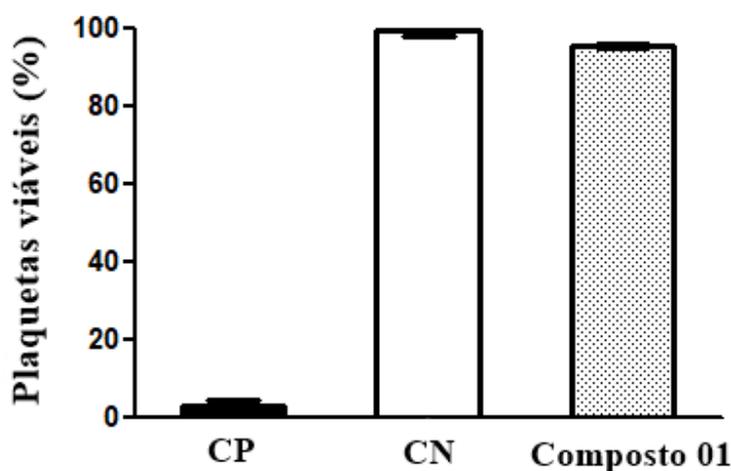
Devido ao favorável efeito antiagregante e anticoagulante apresentado pelo Composto **01**, aliado ao fato de que a atividade anticoagulante do Composto **02** não foi significativa, optou-se por dar continuidade apenas ao estudo do primeiro composto.

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO COM MELHOR ATIVIDADE ANTIAGREGANTE SOBRE PLAQUETAS

O efeito do Composto **01** sobre a viabilidade plaquetária foi avaliado pelo método de exclusão do Azul de *Trypan*. Na Figura 16, verificou-se que no controle positivo de morte celular, $3,0 \pm 1,5\%$ das plaquetas permaneceram viáveis, enquanto o controle negativo apresentou $99,2 \pm 1,2\%$ de plaquetas viáveis. No PRP tratado com o Composto **01** (500 μ M), foram encontradas $95,1 \pm 0,5\%$ de plaquetas viáveis. Portanto,

considerou-se que o Composto **01** não apresentou efeito tóxico sobre plaquetas humanas.

Figura 16 – Efeito do Composto **01** (500 μM) sobre a viabilidade de plaquetas humanas.



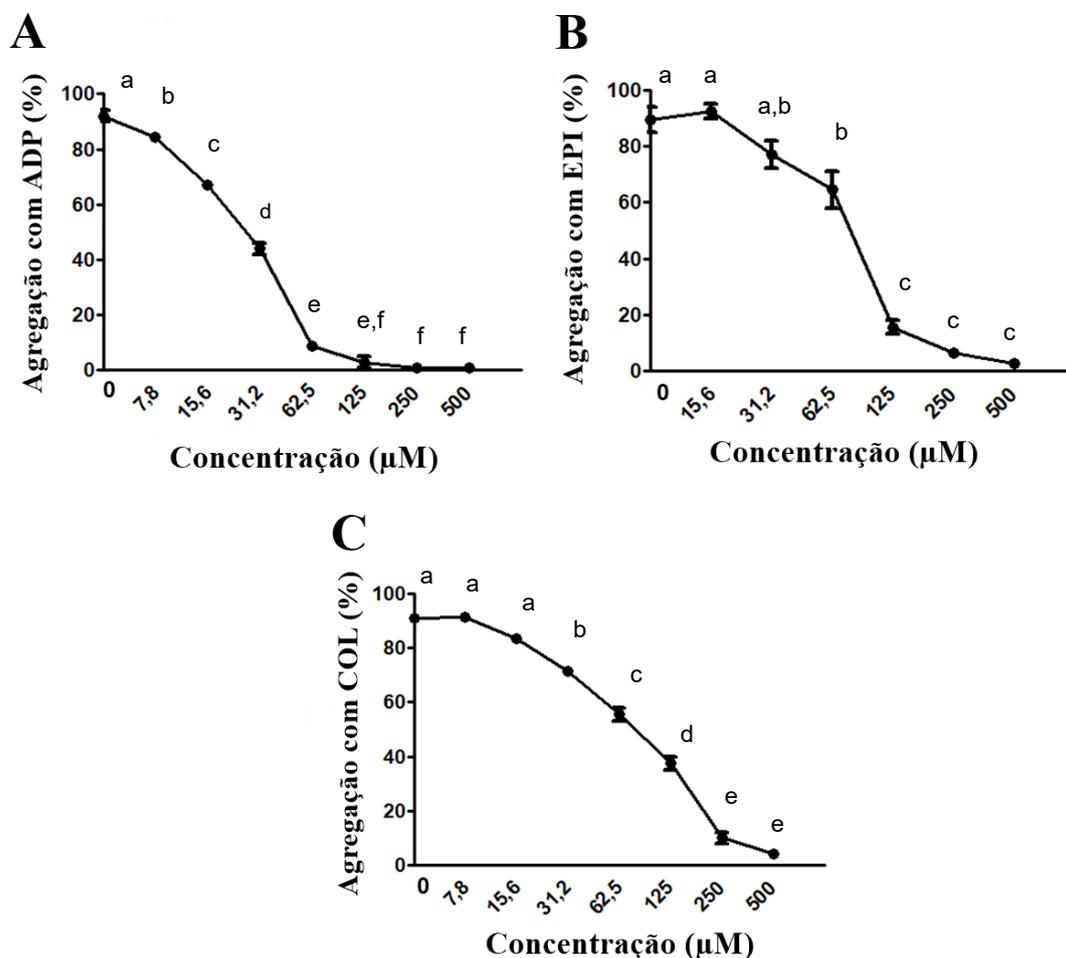
CN (Controle negativo) – DMSO 0,5%; CP (Controle positivo) – *Fix&Perm*. Composto **01** – stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). Fonte: A autora.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE FRENTE À CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO E AO TEMPO DE INCUBAÇÃO

5.5.1 Determinação da CI_{50} do composto frente à agregação plaquetária estimulada por ADP, epinefrina e colágeno

Após verificar que o Composto **01** inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados, e que não foi tóxico para plaquetas humanas, foram realizadas diluições seriadas do composto para determinar a sua CI_{50} para cada agonista e para verificar se a atividade antiagregante era concentração-dependente. Ao avaliar a Figura 17, verifica-se que a inibição da agregação plaquetária foi concentração-dependente para todos os agonistas testados. A melhor CI_{50} foi obtida quando o ADP ($20,44 \pm 1,21 \mu\text{M}$) foi utilizado como agonista, enquanto a epinefrina ($64,69 \pm 3,32 \mu\text{M}$) e o colágeno ($67,34 \pm 1,45 \mu\text{M}$) apresentaram CI_{50} semelhantes.

Figura 17 – Curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP, epinefrina e colágeno em função da concentração do Composto **01**.



Painel A: Curva de agregação concentração-dependente induzida por difosfato de adenosina (ADP – 10 μM). Painel B: Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina (EPI – 5 μg/mL).

Painel C: Curva de agregação concentração-dependente induzida por colágeno (COL – 2 μg/mL).

Composto **01** – stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (N = 3). Letras “a”, “b” e “c” – Os pontos identificados com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre si, pontos identificados com letras iguais não tiveram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. Fonte: A autora.

5.5.2 Avaliação do efeito antiagregante do composto frente ao tempo de incubação

Para avaliar se o efeito antiagregante do Composto **01** era dependente do tempo de incubação, este foi incubado com o PRP em uma concentração subótima (15,6 μM), durante os períodos de 5 e 15 minutos e, posteriormente, o PRP tratado foi estimulado com ADP, epinefrina ou colágeno (Tabela 4). A agregação média obtida após 15 minutos de incubação com o composto não foi significativamente diferente da média

encontrada após 5 minutos de incubação (ADP – P = 0,152; EPI – P = 0,169; COL – P = 0,574).

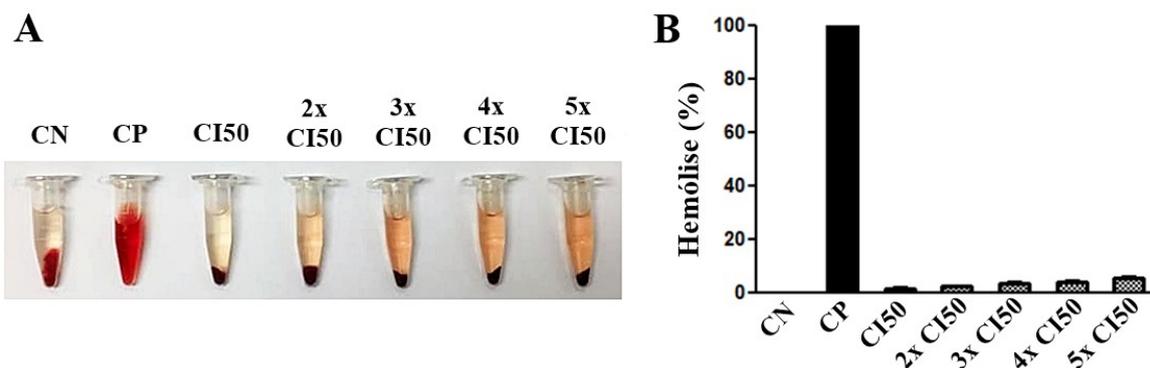
Tabela 4 – Efeito antiagregante do Composto **01** (15,6 μ M) em relação a diferentes períodos de incubação (5 e 15 minutos).

Tratamento	ADP Média \pm DP (%)	Epinefrina Média \pm DP (%)	Colágeno Média \pm DP (%)
Controle (DMSO 0,5%)	94,6 \pm 1,5	91,0 \pm 1,4	93,5 \pm 0,7
Composto 01 – 5 minutos	70,3 \pm 1,5	65,3 \pm 4,5	61,3 \pm 4,1
Composto 01 – 15 minutos	73,3 \pm 2,5	70,3 \pm 2,5	63,6 \pm 5,1

ADP – difosfato de adenosina; DP – desvio padrão; DMSO – dimetilsulfóxido; Composto **01** – stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 e 15 minutos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). Teste t de *Student* para amostras independentes. Fonte: A autora.

5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO COMPOSTO SOBRE ERITRÓCITOS

A toxicidade do composto sobre eritrócitos saudáveis foi avaliada por meio do teste de hemólise, que mensura a absorbância da hemoglobina liberada devido à ruptura da membrana eritrocitária após um período de incubação com o composto. O Composto **01** foi testado na concentração de sua CI_{50} frente ao ADP e até cinco vezes a concentração inicial. Nas concentrações de 20,44 μ M (CI_{50}), 40,88 μ M (2x CI_{50}) e 61,32 μ M (3x CI_{50}), as taxas de hemólise foram de 1,1 \pm 0,7%, 2,3 \pm 0,2% e 3,3 \pm 0,3%, respectivamente. Já nas maiores concentrações, as taxas de hemólise foram de 4,0 \pm 0,5% (81,76 μ M – 4x CI_{50}) e 5,1 \pm 0,9% (102,2 μ M – 5x CI_{50}). Portanto, considerando-se adequados os valores abaixo de 5% de hemólise (MARKOWICZ-PIASECKA et al., 2018), os dados demonstram que o Composto **01** não possui efeito hemolítico expressivo sobre eritrócitos saudáveis em concentrações até cinco vezes superiores à sua CI_{50} . Os resultados desse experimento estão representados na Figura 18.

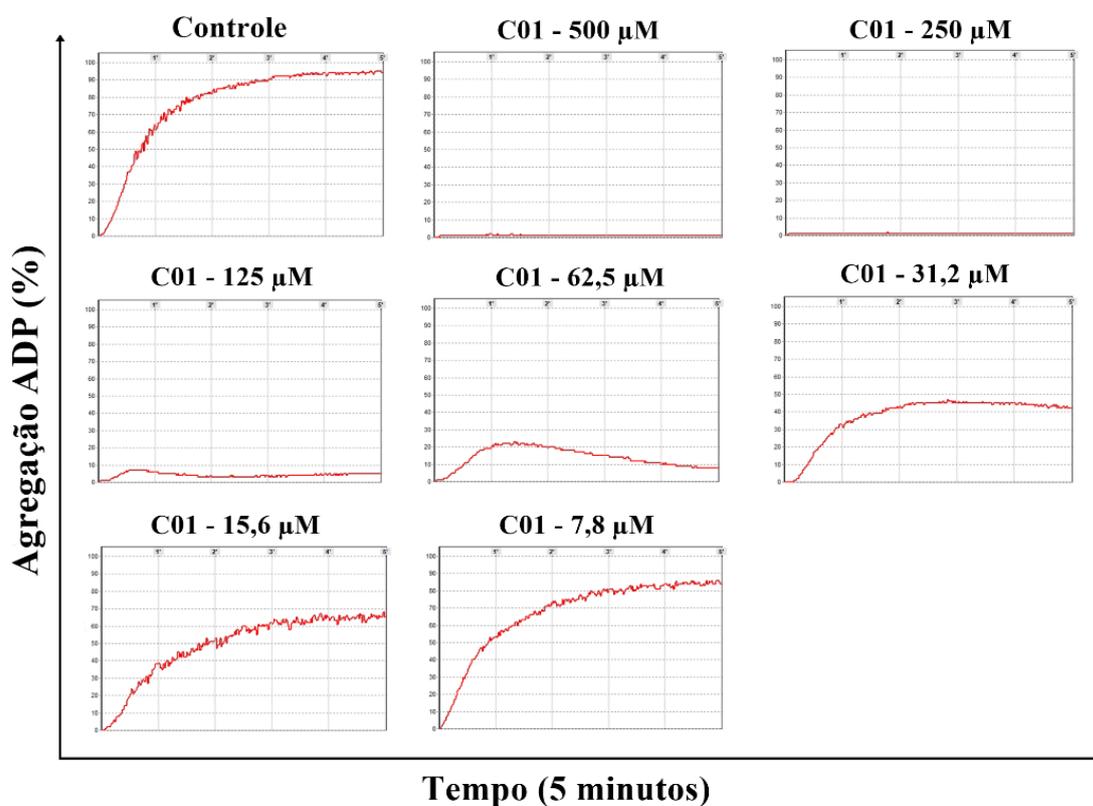
Figura 18 – Efeito hemolítico do Composto **01**.

Painel A: Imagem ilustrativa da intensidade de hemólise nos tubos de um experimento. Painel B: Percentual de hemólise (média \pm desvio padrão) de dois experimentos. CN – Controle negativo (0% hemólise); CP – Controle positivo (100% hemólise); Composto **01** – stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 1 hora. CI₅₀ – 20,44 μ M; 2x CI₅₀ – 40,88 μ M; 3x CI₅₀ – 61,32 μ M; 4x CI₅₀ – 81,76 μ M; 5x CI₅₀ – 102,2 μ M. Fonte: A autora.

5.7 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO

Para compreender melhor o mecanismo de inibição do composto, avaliou-se os perfis das curvas de agregação estimuladas pelos agonistas com diferentes concentrações do composto. Como pode-se observar, na agregação induzida por ADP (Figura 19), o Composto **01** inibiu totalmente a primeira e a segunda onda de agregação plaquetária em suas maiores concentrações (500 e 250 μ M). Já nas concentrações intermediárias (125 a 31,2 μ M), o composto inibiu a segunda onda de agregação e reverteu parcialmente a primeira e, em menores concentrações (15,6 e 7,8 μ M), a amplificação da segunda onda foi diminuída e a primeira onda permaneceu preservada, o que reforça que o efeito antiagregante apresentado pelo composto é dependente da concentração.

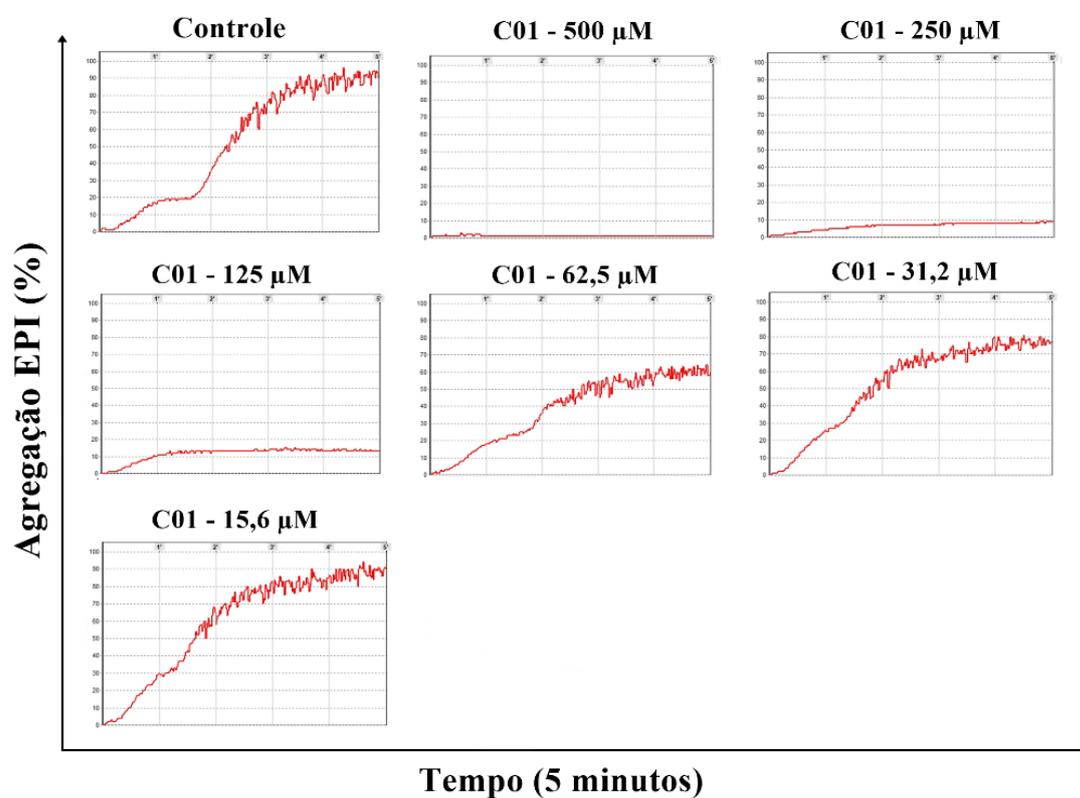
Figura 19 – Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP com diferentes concentrações do Composto **01**.



ADP – difosfato de adenosina (10 µM); Controle – DMSO 0,5 %; C01 – Composto 01 stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: A autora.

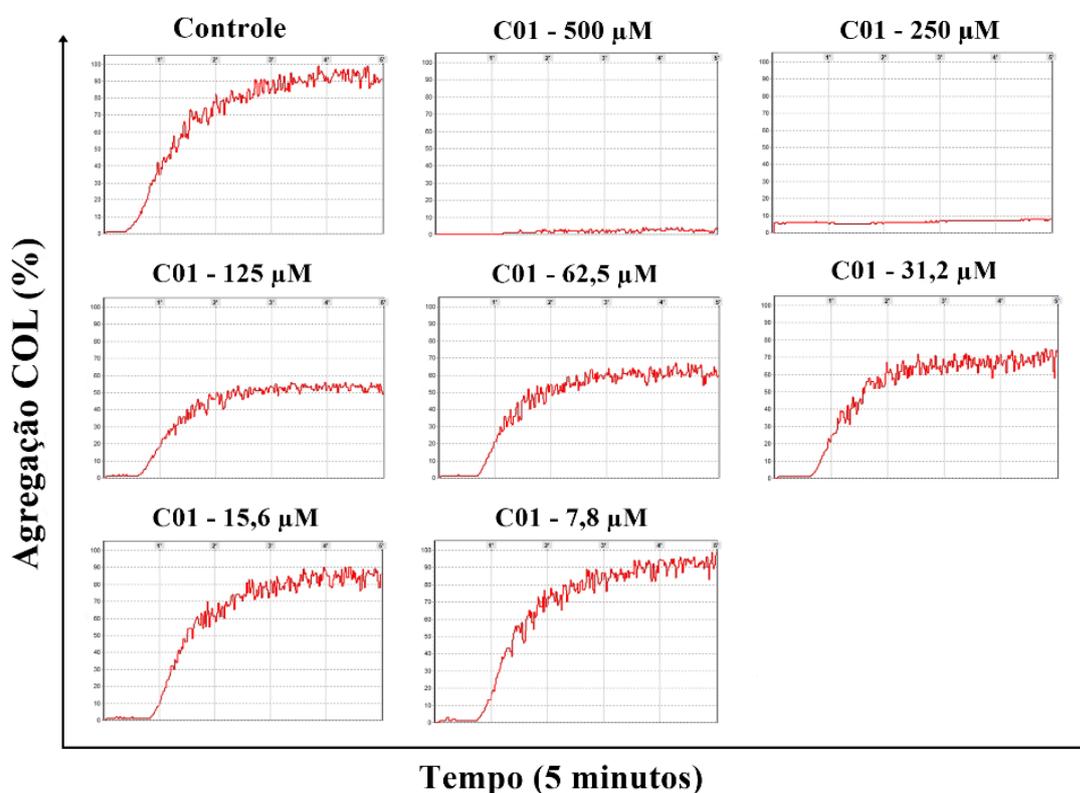
Nas curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina (Figura 20) e colágeno (Figura 21), o composto em suas maiores concentrações (500 e 250 µM) também inibiu totalmente a primeira e a segunda onda de agregação. Já nas concentrações a partir de 62,5 µM para a epinefrina e 125 µM para o colágeno, o composto diminuiu a amplificação apenas da segunda onda de agregação, mas não interferiu na primeira onda.

Figura 20 – Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina com diferentes concentrações do Composto **01**.



EPI – epinefrina (5 µg/mL); Controle – DMSO 0,5 %; C01 – Composto **01** stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: A autora.

Figura 21 – Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por colágeno com diferentes concentrações do Composto **01**.

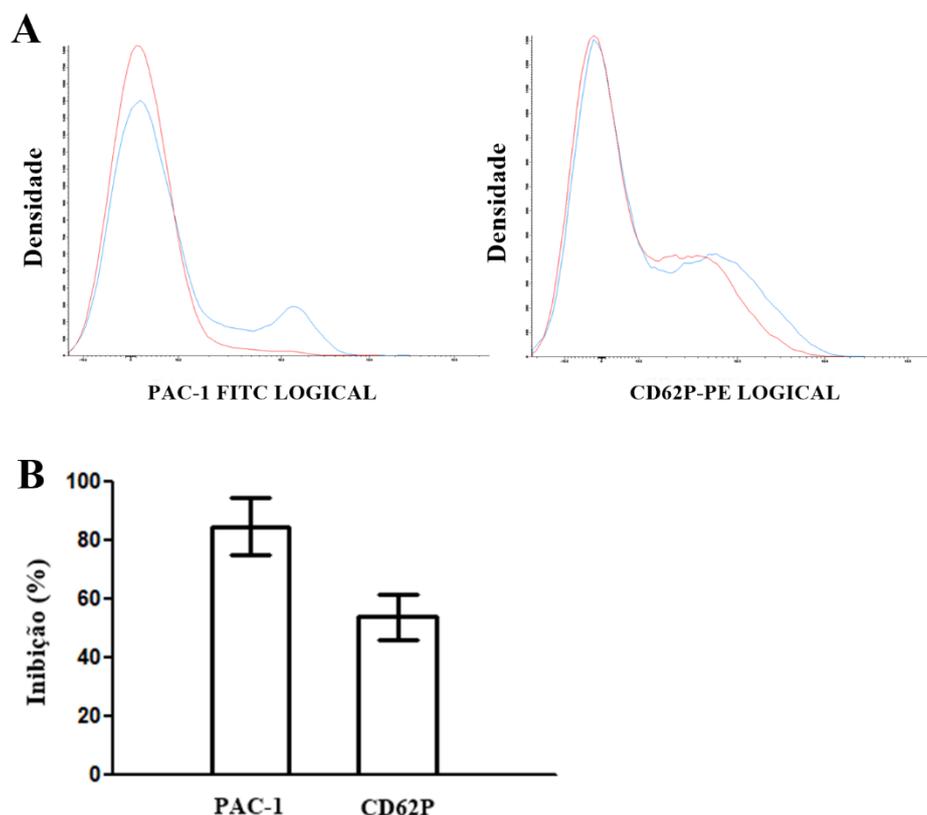


COL – colágeno (2 µg/mL); Controle – DMSO 0,5 %; **C01** – Composto **01** stypoldiona. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: A autora.

5.8 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA

Com o intuito de investigar os mecanismos pelos quais o Composto **01** (500 µM) interfere nas fases de ativação plaquetária, avaliou-se o seu efeito sobre a ativação de GpIIb/IIIa e a expressão membranar de P-selectina, por meio da marcação de plaquetas estimuladas com anti-PAC1 e anti-CD62P, respectivamente. Como se pode visualizar na Figura 22, quando o ADP foi utilizado como agonista, o composto inibiu de maneira mais efetiva a expressão de PAC1 (GpIIb/IIIa ativada), com uma inibição de $84,4 \pm 9,7\%$, quando comparado à expressão de CD62P (P-selectina), que apresentou uma inibição de $53,6 \pm 7,6\%$.

Figura 22 – Efeito do Composto **01** na expressão membranar de GpIIb/IIIa ativada (PAC1) e P-selectina (CD62P) em plaquetas estimulados por ADP.

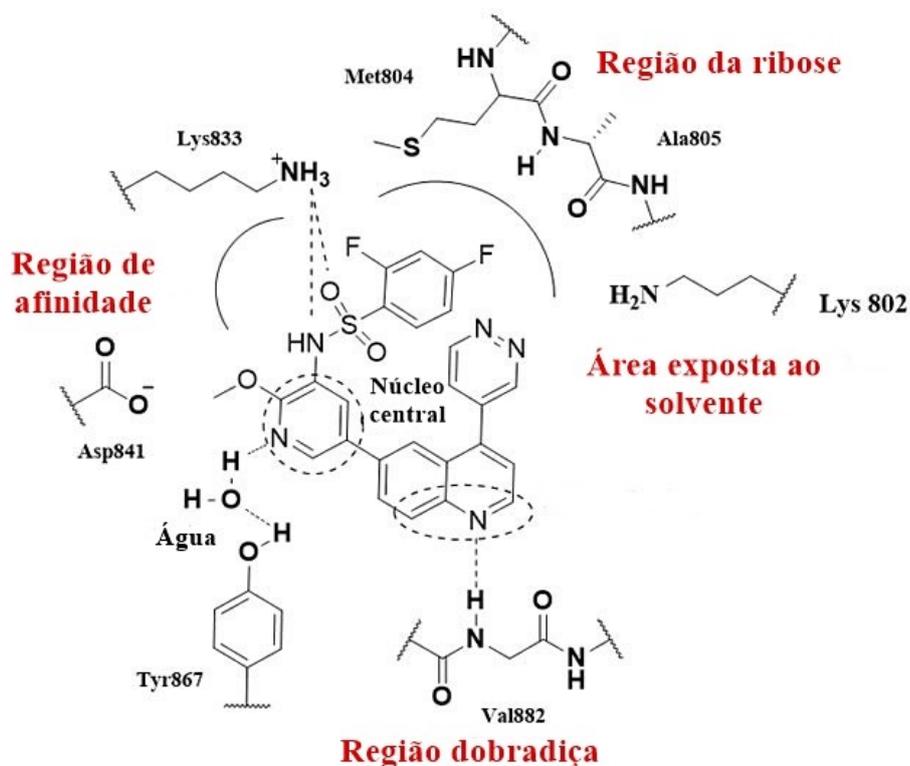


Painel A: Histogramas do efeito do Composto **01** (500 μ M) na expressão de PAC1 e de CD62P. Azul – controle (DMSO 0,5%) estimulado por ADP; Vermelho – Composto **01** estimulado por ADP. Painel B: Taxas de inibição dos marcadores na presença do Composto **01**. ADP – difosfato de adenosina (6 μ M). As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Composto **01** – stypoldiona. Fonte: A autora.

5.9 ESTUDOS DE DOCAGEM MOLECULAR

Os resultados da docagem molecular foram avaliados por meio do software *Discovery Studio Visualizer 2019*, que permitiu a identificação de interações relevantes entre o Composto **01** e o sítio de ligação da enzima PI3K γ . De um modo geral, conforme a Figura 23 que demonstra as interações da PI3K γ com um determinado inibidor, o sítio ativo da PI3K contém quatro regiões principais: a região da dobradiça (Val 882), a região de afinidade (Lys 833, Asp 841, Tyr 867, Ala 885, Ser 806), a região de ribose (Met 804, Ala 805, Lys 802, Met 953, Asp 964, Trp 812) e a área exposta ao solvente (LIU et al., 2017).

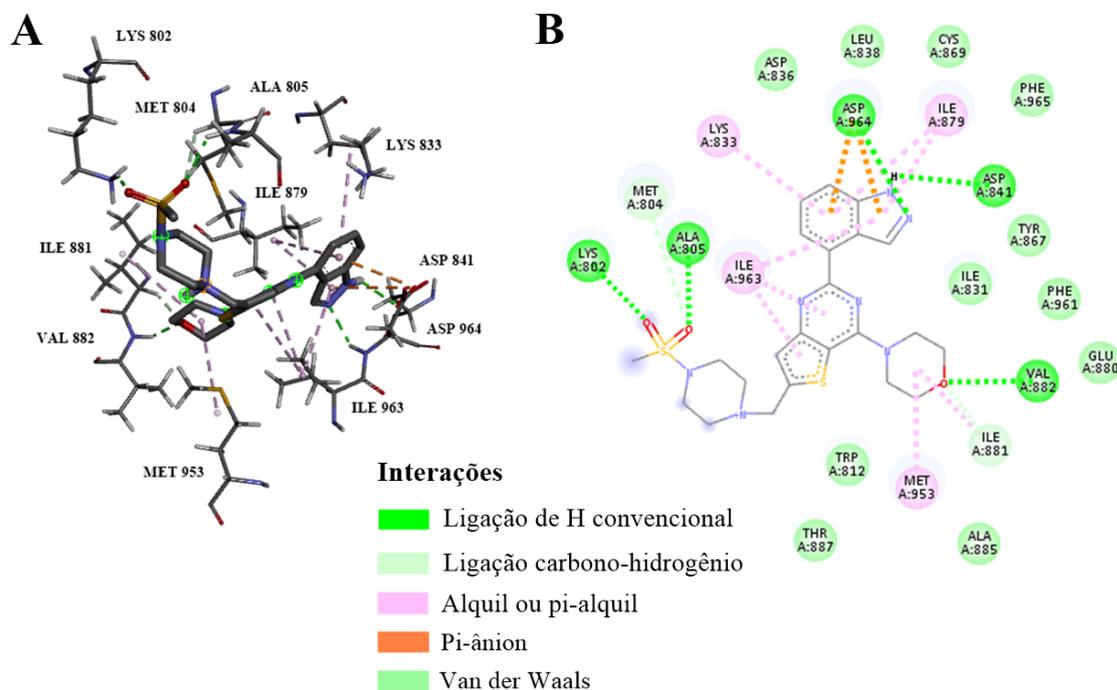
Figura 23 – Potenciais interações entre o sítio ativo da enzima PI3K γ e o inibidor GSK2126458.



Fonte: Adaptado de LIU et al., 2017.

Dessa forma, na Figura 24 é possível visualizar as interações entre a subunidade catalítica PI3K γ (PDB: 3DBS) e o inibidor GDC-0941 que foram avaliadas na docagem molecular. O inibidor se ligou ao sítio ativo da enzima em sua melhor pose com um RMSD de 0,0 Å (RMSD < 2,0 Å) e uma energia de ligação de -9,6 Kcal/mol (escore < -7,0 Kcal/mol). O inibidor interagiu com o aminoácido Val 882 da região da dobradiça e Asp 841, Asp 964, Ala 805 e Lys 802 das regiões de afinidade e de ribose por meio de ligações de H convencionais, além de interagir com Met 804 por meio de ligação carbono-hidrogênio. O inibidor também interagiu com Asp 964, Lys 833 e Met 953 por meio de ligações pi-ânion e pi-alquil. Por fim, o inibidor realizou ligações hidrofóbicas com Tyr 867, Trp 812, Ala 885 e com outros aminoácidos não pertencentes ao sítio ativo

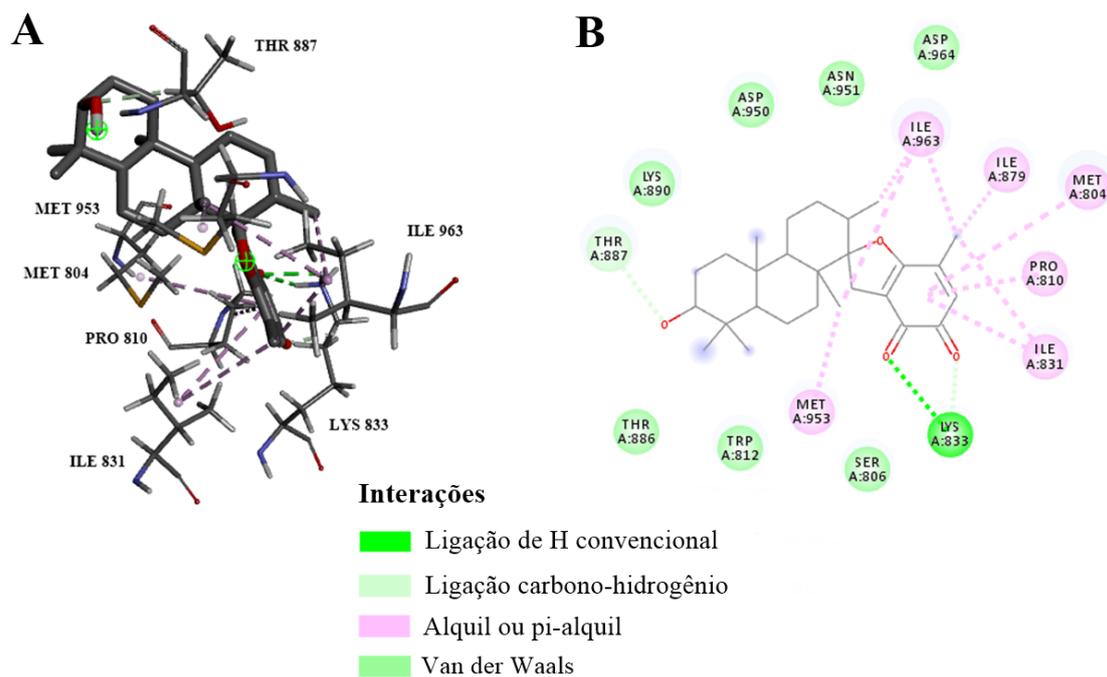
Figura 24 – Interações 2D e 3D entre o sítio ativo da enzima PI3K γ e o inibidor GDC-0941.



Painel A: Interação 3D entre o composto GDC-0941 e o sítio ativo de PI3K γ ; Painel B: Interação 2D entre o composto GDC-0941 e o sítio ativo de PI3K γ . PI3K γ - fosfatidilinositol 3-quinase gama; H – hidrogênio; Lys – lisina; Met – metionina; Ile – isoleucina; Val – valina; Asp – aspartato; Ala – alanina; Leu – leucina; Cys – cisteína; Phe – fenilalanina; Tyr – tirosina; Thr – treonina; Glu – glutamato; Trp – triptofano. Fonte: A autora.

Na Figura 25 é possível observar a subunidade catalítica PI3K γ ligada ao Composto **01**, que interagiu com o sítio ativo da enzima em sua melhor pose com um RMSD de 0,0 Å e uma energia de ligação de -8,9 Kcal/mol. O Composto **01** se ligou ao sítio ativo por meio de ligação de H convencional e ligação carbono-hidrogênio com o aminoácido Lys 833, pertencente à região de afinidade da enzima. O composto também interagiu com Met 804 e Met 953 da região de ribose e Ile 963, Ile 831 e Pro 810 por meio de ligações do tipo pi-alquil, além de realizar uma ligação carbono-hidrogênio com Thr 887. Em relação às ligações hidrofóbicas, o composto interagiu com Asp 964, Trp 812 e Ser 806 do sítio ativo.

Figura 25 – Interações 2D e 3D entre o sítio ativo da enzima PI3K γ e o Composto **01**.



Painel A: Interação 3D entre o Composto **01** e o sítio ativo de PI3K γ ; Painel B: Interação 2D entre o Composto **01** e o sítio ativo de PI3K γ . Composto **01** – stypoldiona; PI3K γ – fosfatidilinositol 3-quinase gama; H – hidrogênio; Lys – lisina; Met – metionina; Ile – isoleucina; Thr – treonina; Pro – prolina; Asp – aspartato; Asn – asparagina; Trp – triptofano; Ser - serina. Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

Os produtos de origem natural são considerados uma promissora fonte de moléculas e/ou protótipos de fármacos (WANG; DONG; SHENG, 2019). Entre os anos de 1981 e 2014, dos 1.562 novos fármacos aprovados pelo FDA dos Estados Unidos da América (ou organizações similares), 42% eram de origem natural, derivados de produtos naturais ou sintéticos que mimetizavam um produto natural. No âmbito da hemostasia, dos 22 anticoagulantes e dos 30 antitrombóticos aprovados na mesma época, 17 e 16 eram de origem natural ou inspirados em moléculas de origem natural, respectivamente (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Nos últimos 50 anos, muitos produtos naturais de origem marinha foram descobertos, sendo que esses produtos apresentam várias vantagens quando comparados aos compostos não naturais, tais como: alta diversidade química, especificidade bioquímica, eficiência de ligação e propensão para interagir com alvos biológicos (MARTINS et al., 2014). Em relação às algas marinhas, alguns de seus metabólitos secundários já demonstraram possuir uma ampla gama de atividades farmacológicas (CUMASHI et al., 2007; DOMINGOS et al., 2011; MOURA et al., 2014; SOUZA et al., 2007), o que evidencia o seu potencial como fonte de novos compostos com atividades biológicas.

Diante disso, o presente estudo investigou o efeito dos compostos stypoldiona (Composto **01**) e fucosterol (Composto **02**), provenientes das algas marinhas *S. zonale* e *D. jolyana*, respectivamente, sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana.

Antes de iniciar os testes *in vitro*, foram calculados os parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski e Veber dos Compostos **01** e **02** (Tabela 1). Pela análise dos dados computacionais, verificou-se que o Composto **01** permaneceu dentro de todos os critérios adequados para uma boa biodisponibilidade oral, o que sugere que o composto possa ser administrado por essa via. Da mesma forma, os medicamentos de referência AAS e ticlopidina não violaram nenhuma das regras previamente estipuladas, o que está em concordância com o fato de que esses fármacos são administrados por via oral na prática clínica. Para um fármaco antitrombótico, a biodisponibilidade oral é interessante, pois essa via de administração facilita a adesão ao tratamento quando comparado aos medicamentos administrados por via sistêmica (MARQUES; PIERIN, 2008).

Já o Composto **02** violou uma das regras de Lipinski, pois seu mLogP foi superior a 5,0. Sabe-se que moléculas que apresentam maior coeficiente de partição tendem a apresentar maior taxa de permeabilidade pelas biomembranas hidrofóbicas, apresentando um melhor perfil de biodisponibilidade e aumento da atividade farmacológica. Em contrapartida, o processo de absorção oral de um fármaco é muito dependente da sua concentração em solução, após a liberação do princípio ativo, fenômeno que é favorecido pelo seu perfil de hidrossolubilidade. Essa dicotomia exige que um protótipo candidato a fármaco apresente propriedades físico-químicas balanceadas, de forma a se ajustar às características de cada uma das biofases percorridas (BARREIRO; FRAGA, 2015). No caso do Composto **02**, apesar deste violar uma das regras, todos os demais parâmetros encontravam-se em conformidade. Portanto, apenas uma violação não inviabilizaria o uso do Composto **02**, e por isso, sugere-se que a molécula possa ser administrada por via oral.

A estrutura dos Compostos **01** e **02** também foi submetida à predição teórica da toxicidade (Figura 13). De acordo com os testes, a estrutura do Composto **01** apresentou baixo risco de toxicidade para todos os parâmetros avaliados, o que sugere que o composto possa prosseguir para os demais testes *in vitro*. O Composto **02**, por sua vez, apresentou elevado risco de efeito irritante. De forma semelhante, o AAS apresentou elevado risco de mutagenicidade, efeito irritante e efeito negativo sobre a reprodução e, apesar dos achados desfavoráveis *in silico*, ele tem sido administrado há mais de 40 anos e é o antiplaquetário mais prescrito na clínica (BERGER et al., 2006). Essas diferenças entre os resultados computacionais e a prática clínica indicam que um resultado desfavorável *in silico* não deva ser o único motivador para descontinuar investigações sobre os potenciais efeitos de um novo composto. Diante disso, optou-se por continuar com os estudos com Composto **02**, visto que ele alterou apenas um dos parâmetros avaliados.

Após constatar que os compostos possuíam boa biodisponibilidade oral e um perfil toxicológico aceitável *in silico*, prosseguiu-se com os testes *in vitro*. Inicialmente, foi realizada uma triagem para avaliar o efeito dos compostos sobre os testes de TP e TTPa, que avaliam o funcionamento da via extrínseca e intrínseca da cascata de coagulação, respectivamente (PALTA; SAROA; PALTA, 2014). Após a realização dos experimentos, verificou-se que o Composto **01** (500 µM) prolongou de forma significativa o TP, mas não alterou o TTPa (Tabela 2). Por prolongar apenas o TP, sugere-se que o composto

esteja interferindo em alguma etapa da via extrínseca, sem interferir nas vias intrínseca e comum. Observou-se também que a atividade sobre essa via era concentração-dependente (Figura 14), uma vez o TP foi prolongado conforme a concentração do composto aumentou, apresentando uma CE_{50} de $236,7 \pm 1,26 \mu\text{M}$. Não foi encontrado na literatura consultada outro estudo que determinasse a CE_{50} de compostos isolados de produtos naturais frente aos testes de coagulação sanguínea. Porém, em um estudo realizado com um análogo do anticoagulante apixaban (inibidor direto do FXa), a CE_{50} calculada para o TTPa foi de $4,4 \mu\text{M}$ (MACOR, 2009), o que demonstra que a CE_{50} do Composto **01** é elevada quando comparada a de fármacos já disponíveis no mercado.

Além disso, apesar do Composto **01** prolongar o TP de forma significativa, este prolongamento não foi considerado clinicamente relevante devido ao valor de RNI calculado. O TP avalia o tempo necessário para a formação de um coágulo de fibrina após a adição de íons Ca^{+2} e tromboplastina (FT) a um plasma citratado e, devido às diferenças na sensibilidade dos reagentes disponíveis no mercado, a OMS recomenda que os resultados sejam padronizados utilizando-se uma tromboplastina de referência mundial a partir da qual se calcula um índice de correção denominado índice de sensibilidade internacional (ISI). Dessa forma, o RNI é calculado pela relação do TP obtido no teste com o TP de um *pool* “normal”, elevado ao ISI fornecido pelo fabricante. Sabe-se que em indivíduos saudáveis e não anticoagulados, o RNI encontra-se entre 1,0 e 1,3, enquanto em indivíduos anticoagulados, o RNI terapêutico varia entre 2,0 e 3,0 (SERRALVO; ZAMBOTI; BREGANO, 2015; SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2018). No caso do Composto **01**, o RNI obtido após o tratamento foi de 1,5, demonstrando que o prolongamento não foi clinicamente importante por estar mais próximo ao RNI de indivíduos não anticoagulados. Dessa forma, a atividade anticoagulante do Composto **01** não foi considerada promissora.

O Composto **02** ($500 \mu\text{M}$), por sua vez, não alterou o TP e encurtou significativamente o TTPa (Tabela 2). Entretanto, apesar do composto ter encurtado de forma estatisticamente significativa o TTPa, essa metodologia não possui validação para avaliar atividade pró-coagulante, devido a limitações de sensibilidade do ensaio. O TTPa é amplamente utilizado para avaliação de distúrbios hemorrágicos ocasionados pela diminuição na concentração de fatores envolvidos na via intrínseca e comum da coagulação, entretanto, o teste frequentemente apresenta valores normais na presença de concentração elevada dos fatores de coagulação no plasma, não sendo indicado para

avaliação de estados de hipercoagulabilidade. Além disso, pelo fato de o TTPa ser realizado com PPP, não é possível avaliar a interação entre plaquetas e fibrinogênio e, como consequência, não é mensurada a real taxa de formação e a resistência do coágulo nesse ensaio (LUGASSY et al., 2001; PARK et al., 2009). Portanto, como o Composto **02** não apresentou atividade relevante sobre a coagulação sanguínea, optou-se por não dar continuidade à investigação de seu efeito sobre a hemostasia secundária.

Posteriormente, avaliou-se o efeito dos compostos sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina e colágeno. O tratamento com o Composto **01** na sua maior concentração (500 μM) inibiu significativamente a agregação induzida por todos os agonistas, gerando agregações médias inferiores a 50% (Tabela 3), assim como alterou expressivamente a primeira e segunda onda de agregação (Figura 15). Quando o PRP foi tratado com o Composto **02** (500 μM), este também diminuiu de forma significativa a agregação induzida por ADP e epinefrina (Tabela 3), entretanto, os percentuais de agregação foram em média acima de 50% e houve alteração apenas na segunda onda da curva de agregação (Figura 15). No presente estudo, se considerou pouco promissor o composto que não foi capaz de causar inibições que gerem agregações inferiores a 50% na maior concentração testada, visto que a CI_{50} calculada provavelmente seria maior que 500 μM , uma concentração difícil de ser reproduzida *in vivo*. Dessa forma, concluiu-se que o Composto **02** não apresentou atividade antiagregante favorável e optou-se por descontinuar os estudos com este composto e permanecer apenas com o Composto **01** para os demais ensaios.

Como anteriormente mencionado, um estudo realizado por O'Brien e colaboradores (1984) determinou que a stypoldiona na dose de 100 mg/kg não era tóxica para ratos após 24 horas de tratamento. Diferentemente do relatado para ratos, Gerwick e colaboradores (1979) observaram que a stypoldiona era tóxica para peixes. Dessa forma, apesar do achado favorável em ratos, essas diferenças de toxicidade entre as espécies tornam necessário avaliar se o Composto **01** era potencialmente tóxico para células humanas, especialmente as plaquetas, que são o alvo de investigação da pesquisa. Por isso, no presente estudo, avaliou-se o efeito do Composto **01** sobre a viabilidade plaquetária pelo método de exclusão do Azul de *Trypan* (Figura 16) e verificou-se que o composto em sua maior concentração (500 μM) não foi tóxico para as células avaliadas, o que é favorável ao prosseguimento com os estudos *in vivo*. Adicionalmente, esse resultado permite concluir que o efeito antiagregante não estava

relacionado à perda de viabilidade das plaquetas, mas sim a um bloqueio nos processos de ativação plaquetária.

Após verificar que o Composto **01** inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados, e que não foi tóxico para plaquetas humanas, foi avaliado se o efeito antiagregante do Composto **01** era concentração ou tempo-dependente. Como pode ser observado na Figura 17 e na Tabela 4, o efeito antiagregante do Composto **01** foi concentração-dependente para todos os agonistas testados, mas não foi tempo-dependente. A melhor CI_{50} calculada foi a obtida quando o ADP ($20,44 \pm 1,21 \mu\text{M}$) foi utilizado como agonista, enquanto a epinefrina ($64,69 \pm 3,32 \mu\text{M}$) e o colágeno ($67,34 \pm 1,45 \mu\text{M}$) apresentaram CI_{50} semelhantes. Ao correlacionar esses resultados com a CE_{50} obtida para o TP, observou-se que as concentrações necessárias para induzir um efeito antiagregante eram muito inferiores à concentração necessária para atingir um efeito anticoagulante ($236,7 \pm 1,26 \mu\text{M}$), o que indica que o composto nas concentrações de sua CI_{50} estimula apenas um efeito antiagregante, sem interferir na fase de coagulação. Do ponto de vista farmacológico, é interessante que uma molécula apresente alta atividade antiplaquetária e baixa atividade anticoagulante, uma vez que moléculas com ambas as atividades apresentam maior risco de desencadear efeitos adversos, como hemorragias graves (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

Em um estudo realizado com diterpenos isolados da alga parda *Dictyota menstrualis*, pertencente à mesma ordem de *S. zonale*, a CI_{50} calculada para um dos compostos foi de $310 \mu\text{M}$ para o ADP e $1.060 \mu\text{M}$ para o colágeno, enquanto o outro composto gerou agregações superiores a 50% e não teve a sua CI_{50} calculada (MOURA et al., 2014). Da mesma forma, um estudo realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito antiagregante de dois compostos isolados da alga parda *Dictyopteris jolyana*, e a CI_{50} calculada para um dos compostos foi de $441,5 \pm 4,8 \mu\text{M}$ para o ADP, de $407,3 \pm 7,0 \mu\text{M}$ para a epinefrina e de $319,2 \pm 7,5 \mu\text{M}$ para o colágeno, enquanto o outro composto teve a sua CI_{50} calculada apenas para a epinefrina ($476,1 \pm 13,8 \mu\text{M}$) (SYRACUSE, 2018). Dessa forma, pode-se concluir que o efeito antiagregante do Composto **01** é bastante promissor quando comparado ao efeito de outros compostos obtidos de algas pardas da mesma ordem, visto que a CI_{50} permaneceu abaixo de $100 \mu\text{M}$ para todos os agonistas testados.

Após a determinação da CI_{50} , a toxicidade do composto sobre eritrócitos

saudáveis foi avaliada pelo teste de hemólise (Figura 18), uma vez que os eritrócitos constituem um dos primeiros componentes celulares com que compostos ou substâncias entram em contato após administração sistêmica. O Composto **01** foi testado na concentração de sua CI_{50} e até cinco vezes a concentração inicial. Com os ensaios, verificou-se que mesmo em concentrações cinco vezes superiores à sua CI_{50} , o composto apresentou-se ligeiramente hemolítico ($5,1 \pm 0,9\%$), o que foi considerado adequado para a realização de posteriores testes *in vivo* (MARKOWICZ-PIASECKA et al., 2018). Não foi encontrado na literatura estudos que avaliassem o efeito hemolítico de extratos ou compostos isolados de algas marinhas para comparar com os resultados. Contudo, o fato do composto ser levemente hemolítico mesmo em concentrações cinco vezes superiores à sua CI_{50} é um achado favorável, pois indica que o composto pode ser testado em altas concentrações *in vivo*, de modo a alcançar a concentração plasmática desejável para atingir o efeito farmacológico sem causar hemólise.

Para compreender melhor o mecanismo de inibição, foram avaliados os perfis das curvas de agregação após o tratamento do PRP com diferentes concentrações do composto. Na agregação induzida por todos os agonistas, o Composto **01** inibiu totalmente a primeira e a segunda onda de agregação em suas maiores concentrações (500 e 250 μM), porém, nas concentrações intermediárias (125 a 31,2 μM), o composto inibiu totalmente a segunda onda de agregação e reverteu parcialmente a primeira quando o ADP foi utilizado como agonista (Figura 19). Nas curvas de agregação induzidas por epinefrina (Figura 20) e colágeno (Figura 21), o composto em suas concentrações intermediárias (125 μM e 62,5 μM) diminuiu a amplificação da segunda onda de agregação, mas não interferiu na primeira onda, fato que sugere que o mecanismo de inibição frente ao ADP difere da inibição frente aos demais agonistas testados, o que explica as diferenças entre as CI_{50} encontradas.

Em relação ao perfil das curvas, sabe-se que a agregação plaquetária ocorre após a ligação de agonistas a seus receptores acoplados a proteínas G_q e G_i , sendo que essas ligações transduzem sinais de ativação plaquetária, gerando a primeira onda de agregação. Posteriormente, as vias de sinalização ativadas por diferentes agonistas convergem para vias de sinalização comuns, amplificando os sinais desencadeados pela ligação ao receptor, gerando assim a segunda onda. No caso do ADP, este é capaz de ativar os mediadores G_q e G_i através da ligação com os receptores $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$, respectivamente, sendo o receptor $P2Y_{12}$ responsável por amplificar e estabilizar a

agregação passageira que é iniciada pelo P2Y₁ (ESTEVEZ; DU, 2017; WIJEYERATNE; HEPTINSTALL, 2011).

Portanto, ao inibir totalmente a segunda onda de agregação e reverter parcialmente a primeira, sugere-se que as vias de amplificação de sinal ativadas pela ligação do ADP ao receptor P2Y₁₂ podem estar sofrendo interferência do Composto **01**. De acordo com a literatura, indivíduos que possuem deficiência de P2Y₁₂ apresentam uma agregação reduzida e reversível frente ao ADP. Em casos de defeitos heterozigóticos de P2Y₁₂, há ausência completa da segunda onda de agregação após estímulo com ADP em concentrações inferiores ou iguais a 10 µM, com uma resposta bifásica frente à epinefrina (CATTANEO, 2011; HARRISON et al., 2011), sendo este o mesmo perfil de inibição observado após o tratamento do PRP com o Composto **01**, fato que corrobora a hipótese de que a via de ativação do receptor P2Y₁₂ sofre interferência do composto. O mesmo perfil também foi observado no estudo realizado por Syracuse (2018), em que o extrato bruto da alga *D. jolyana* inibiu a segunda onda e reverteu parcialmente a primeira onda de agregação frente ao ADP, mas quando a epinefrina foi utilizada como agonista, o extrato apenas diminuiu a amplitude da segunda onda de agregação, o que sugere que não houve uma adequada ativação de P2Y₁₂.

Com o intuito de investigar melhor os mecanismos pelos quais o Composto **01** poderia interferir na fase de ativação plaquetária, avaliou-se o seu efeito sobre a ativação da GpIIb/IIIa (PAC-1) e a expressão membranar de P-selectina (CD62P) na presença de ADP. A adesão das plaquetas aos componentes da matriz subendotelial desencadeia, entre outros eventos, a secreção de grânulos plaquetários, como os grânulos alfa. O seu conteúdo granular inclui a P-selectina, uma Gp adesiva que exerce um papel central nas interações entre plaquetas, leucócitos e células endoteliais por meio de sua ligação com a glicoproteína 1 ligante de P-selectina (PSGL-1), o que contribui para o aumento da ativação plaquetária (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013; JENNINGS, 2009).

Durante a ativação plaquetária também ocorre a alteração conformacional do receptor GpIIb/IIIa, o que aumenta a sua afinidade pelas moléculas de fibrinogênio. O fibrinogênio se liga a GpIIb/IIIa ativada, e essa ligação induz outras Gps adesivas a se ligarem nesses receptores, formando “pontes” entre as plaquetas adjacentes, o que contribui para a formação de um trombo rico em fibrinogênio no local da lesão. Todos esses eventos estão associados com a segunda onda de agregação observada na

agregometria (BROOS et al., 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013). No presente estudo, verificou-se que o Composto **01** diminuiu a expressão de ambos os marcadores, mas diminuiu de maneira mais efetiva a expressão de GpIIb/IIIa ativada (Figura 22). Esses resultados corroboram a hipótese de que o Composto **01** esteja atuando sobre a via de ativação de P2Y₁₂, uma vez que estudos com plaquetas humanas com ausência de P2Y₁₂ congênita ou camundongos com deficiência de P2Y₁₂ demonstraram que a agregação e a secreção plaquetária induzida por vários agonistas encontravam-se prejudicadas nessas condições (CATTANEO et al., 2003; FOSTER et al., 2001).

Já está bem estabelecido que existem três famílias de mediadores centrais de ativação plaquetária que são responsáveis por desencadear os eventos críticos de secreção e ativação da GpIIb/IIIa, sendo elas: a PLC, a PKC e a PI3K (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016). Fisiologicamente, a interação do ADP com o receptor P2Y₁₂ resulta na inibição de adenilato (AC) e guanilato ciclase (GC) e na ativação da enzima PI3K γ . Diversos estudos já demonstraram que as diferentes isoformas da enzima PI3K possuem um papel crucial na amplificação da ativação plaquetária mediada pelo receptor P2Y₁₂, de forma que esta via de sinalização contribui para a ativação das demais vias (CATTANEO, 2011). A enzima PI3K é responsável por ativar a PLC γ 2 e a PKC, desencadeando a secreção de mediadores secundários de ativação plaquetária, além de contribuir para a ativação da GpIIb/IIIa por meio de um mecanismo dependente de lipídeos, envolvendo a proteína quinase B serina-treonina (PKB/Akt). Portanto, a inativação desta enzima pode estar relacionada com a inibição da GpIIb/IIIa ativada e sua posterior ligação ao fibrinogênio (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; SCHWARTZ; WALTER; EIGENTHALER, 2001).

Como foi observado no estudo, o Composto **01** foi capaz de inibir a agregação plaquetária frente a todos os agonistas testados, ainda que a melhor CI₅₀ calculada fosse frente ao ADP. Em um estudo realizado por Irfan et al. (2018) com o extrato bruto da alga parda *Eisenia bicyclis*, resultados similares foram obtidos. Nesse estudo, o extrato também foi capaz de inibir a agregação plaquetária frente a todos os agonistas testados: ADP, colágeno e trombina, e a melhor CI₅₀ foi obtida quando o ADP foi utilizado como agonista. Após constatar que o extrato prejudicou os eventos de secreção plaquetária e de ligação da GpIIb/IIIa ao fibrinogênio, investigou-se o mecanismo de ação do extrato pelo método de *western blotting*, e foi verificado que ele inibiu a fosforilação da enzima

PI3K da via do P2Y₁₂ e, como consequência, também diminuiu a fosforilação da PLC γ 2 (IRFAN et al., 2018).

Portanto, levando em consideração todos os testes realizados e a correlação com a literatura, levantou-se a hipótese de que o Composto **01** poderia interferir na via do P2Y₁₂ ao inibir a enzima PI3K γ e, conseqüentemente, a amplificação do sinal pró-agregante e os eventos de secreção plaquetária e ativação da GpIIb/IIIa estariam prejudicados, interferindo também na agregação induzida pelos demais agonistas. Para investigar melhor essa hipótese, realizou-se a docagem molecular do Composto **01** com a enzima PI3K γ . Os membros da família PI3K são quinases lipídicas que catalisam a transferência do gama-fosfato do ATP para o grupo 3-hidroxila do PIP₂, gerando assim o 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP₃), um segundo mensageiro que ativa outras proteínas quinases, como a PKB/Akt (JANKU, 2017; TOKER; CANTLEY, 1997). De acordo com sua especificidade de estrutura e substrato, as PI3Ks pertencem a três categorias distintas, denominadas classe I, II e III. A classe I é ainda dividida em classe IA e IB, sendo que a classe IA é ativada por tirosina-quinases e consiste em uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade reguladora p85, contendo três isoformas (PI3K α , PI3K β e PI3K δ). Já a classe IB é ativada principalmente por GPCRs e consiste apenas em uma subunidade catalítica p110 denominada PI3K γ (STARK et al., 2015).

Diversos estudos já demonstraram que a enzima PI3K γ desempenha um papel crucial em eventos cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão e trombose, fato que a torna um alvo viável para o tratamento desse grupo de doenças (GHIGO et al., 2013). Devido à alta similaridade estrutural existente entre as isoformas de PI3K, já foi demonstrado que um inibidor de PI3K que interagiu com todas as isoformas da enzima foi capaz de bloquear a fase de ativação plaquetária e, como consequência, diminuir a formação de trombos (WI et al., 2014). De um modo geral, o sítio ativo da PI3K contém quatro regiões principais: região da dobradiça (Val 882), região de afinidade, região de ribose e, por fim, a área exposta ao solvente. Entre elas, os inibidores de PI3K devem interagir principalmente com a Val 882 (interação obrigatória) e com os aminoácidos da região de afinidade, pois essas interações aprimoram a potência do composto (LIU et al., 2017).

No *redocking* com o inibidor GDC-0941 (Figura 24), este se ligou ao sítio ativo da enzima em sua melhor pose com uma energia de ligação de -9,6 Kcal/mol, fato que validou a docagem para testes posteriores, visto que a interação é considerada estável

quando o valor da energia de ligação é inferior a -7 Kcal/mol (TROTT; OLSON, 2010). O inibidor interagiu com vários aminoácidos do sítio ativo por meio de ligações de H convencionais, ligações hidrofóbicas e uma ligação do tipo carbono-hidrogênio. Entre as ligações, é importante destacar que o oxigênio da porção morfolina do inibidor GDC-0941 permaneceu em proximidade com a região da dobradiça da enzima, formando uma ligação de H com a amida da Val 882.

Após validar a docagem, avaliou-se a interação da subunidade catalítica PI3K γ com o Composto **01** (Figura 25), sendo que ele interagiu com a enzima em sua melhor pose com uma energia de ligação de -8,9 Kcal/mol. O Composto **01** se ligou ao sítio ativo por meio de ligação de H convencional e ligação carbono-hidrogênio com o aminoácido Lys 833, em que o oxigênio da porção benzoquinona atuou como um acceptor de hidrogênio ao interagir com a amida de Lys 833, que faz parte da região de afinidade da enzima e está associada à melhor potência e seletividade do composto (LIU et al., 2017). O Composto **01** também interagiu com aminoácidos do sítio ativo por meio de ligações hidrofóbicas e ligações do tipo pi-alquil, que envolvem amplamente a transferência de cargas e auxiliam a intercalar o composto no sítio de ligação do receptor (ARTHUR; UZAIRU, 2019).

Contudo, apesar do composto se ligar com uma boa energia e realizar importantes interações com os aminoácidos da região de afinidade e de ribose da enzima, ele não foi capaz de interagir com a Val 882 da região da dobradiça, que consiste na interação de maior relevância aos inibidores de PI3K. Como se trata de um teste *in silico*, posteriores ensaios biológicos devem ser realizados para confirmar os resultados obtidos na docagem molecular. Além disso, também é importante investigar o efeito do Composto **01** em outros marcadores centrais de ativação plaquetária, como a PLC e a PKC.

Resumidamente, os resultados do presente estudo indicaram que o Composto **02** não teve efeito promissor sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana. O Composto **01**, por sua vez, demonstrou possuir um importante efeito antiagregante, especialmente frente ao ADP. A análise dos perfis das curvas indicou que o Composto **01** poderia estar agindo sobre a via de sinalização desencadeada pelo receptor P2Y₁₂, o que interfere com os eventos de secreção granular e ativação de GpIIb/IIIa, que foram comprometidos na presença do composto. Para confirmar tal hipótese, avaliou-se a interação do composto com a enzima PI3K por meio da docagem

molecular, em que foi verificado que o composto se ligou ao sítio ativo da enzima com uma boa energia de ligação, mas não foi capaz de interagir com o principal aminoácido. Posteriores testes *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar o mecanismo de ação e a toxicidade do composto. Contudo, ainda que não tenha sido possível elucidar o mecanismo de ação, pode-se inferir que o Composto **01** apresentou uma atividade antiagregante favorável, o que indica que o composto possa ser utilizado como um protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

7 CONCLUSÃO

A compilação dos resultados do presente estudo permite concluir que:

- Os estudos *in silico* sugeriram que as estruturas dos Compostos **01** e **02** possuem boa biodisponibilidade oral e um perfil toxicológico adequado para posteriores testes *in vitro*;
- O Composto **02** não apresentou atividade anticoagulante ou antiagregante promissoras;
- O Composto **01** prolongou de forma significativa o TP, entretanto, o efeito anticoagulante não foi considerado clinicamente relevante;
- O Composto **01** teve um efeito antiagregante promissor frente a todos os agonistas testados (ADP, epinefrina e colágeno);
- O Composto **01** não foi tóxico para plaquetas humanas;
- O Composto **01** inibiu a agregação de forma concentração-dependente, demonstrando uma melhor inibição frente ao ADP, com uma CI_{50} de $20,44 \pm 1,21 \mu\text{M}$;
- O Composto **01** foi ligeiramente hemolítico a partir de concentrações cinco vezes superiores à sua CI_{50} ;
- Os perfis de inibição das curvas de agregação plaquetária estimulados por ADP com diferentes concentrações do Composto **01** sugerem que ele pode estar interferindo com a via de ativação do receptor $P2Y_{12}$;
- O Composto **01** diminuiu de maneira mais efetiva a expressão de GpIIb/IIIa ativada quando comparado à expressão de P-selectina após estímulo com ADP;
- Ensaios de docagem molecular demonstraram que o Composto **01** não foi capaz de interagir com o principal aminoácido da enzima $PI3K\gamma$ da via do $P2Y_{12}$ *in silico*;

Dessa forma, conclui-se que o Composto **01** (stypoldiona) pode ser utilizado como um protótipo no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito do Composto **01** sobre a proteína PI3K γ por meio de ensaio imunoenzimático;
- Investigar a fosforilação das proteínas PI3K γ , PLC e PKC pelo método de *Western Blotting*;
- Avaliar a permeabilidade intestinal do Composto **01** *in vitro*;
- Realizar estudos de modelagem molecular e investigar a relação entre estrutura e atividade do Composto **01**;
- Estudar o efeito do Composto **01** em ensaios com modelos de trombose *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier/Medicina Nacionais, 2010, 732 p.
- ABDUL, Q. A. et al. Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. **J Sci Food Agric.**, v. 96, n. 6, p. 1856-66, 2016.
- AKAY, O. M. et al. Aspirin-resistance frequency: a prospective study in 280 healthy Turkish volunteers. **Clin Appl Thromb Hemost.**, v. 15, n. 1, p. 98-102, 2009.
- ALVES, C. et al. From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. **Front Pharmacol.**, v. 9, n. 777, 2018.
- ANGIOLILLO, D. J.; FERREIRO, J. L. Platelet Adenosine Diphosphate P2Y12 Receptor Antagonism: Benefits and Limitations of Current Treatment Strategies and Future Directions. **Rev Esp Cardiol.**, v. 63, n. 1, p. 60-76, 2010.
- ANGIOLILLO, D. J.; UENO, M.; GOTO, S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. **Circ J.**, v. 74, n. 4, p. 597-607, 2010.
- ARTHUR, D. E.; UZAIRU, A. Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. *Journal of King Saud University – Science*, v. 31, n. 4, p. 1151-1166, 2019.
- AUSTIN, S. K. Haemostasis. **Medicine**, v. 45, n. 4, p. 204-208, 2017.
- AVELAR-FREITAS, B. A. et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 4, p. 307-315, 2014.
- AZEVEDO, L. G. et al. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. **Comp Biochem and Physiol.**, v. 147, p.36-42, 2008.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2015, 608 p.

BECATTINI, C.; LIGNANI, A.; AGNELLI, G. New anticoagulants for the prevention of venous thromboembolism. **Drug Des Devel Ther.**, v. 25, n. 4, p. 49-60, 2010.

BERGER, J. S. et al. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. **JAMA**, v. 295, n. 3, p. 306-313, 2006.

BERNDT, M. C.; METHAROM, P.; ANDREWS, R. K. Primary haemostasis: newer insights. **Haemophilia.**, v. 4, p. 15-22, 2014.

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**, v. 270, n. 18, p. 3760-3767, 2013.

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

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

BRASIL. Secretaria da Saúde. Sociedade brasileira de cardiologia. **Manual de prevenção cardiovascular**. 1º ed. Rio de Janeiro, 2017.

BRASS, L. F. et al. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. **J Thromb Haemost.**, v. 9, n. 1, p. 66-75, 2011.

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

BYE, A. P. UNSWORTH, A. J.; GIBBINS, J. M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. **J Thromb Haemost**, v. 14, n. 5, p. 918-930, 2016.

CAI, G. et al. Aspirin resistance and other aspirin-related concerns. **Neurol Sci.**, v. 37, n. 2, p. 181-189, 2016.

CAMARA, R.B.G et al. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Mar Drugs**, v. 9, p. 124-38, 2011.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CATTANEO, M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. **Blood**, v. 117, n. 7, p. 2102-12, 2011.

CATTANEO, M. et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 100, n. 4, p. 1978-83, 2003.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Rev.**, v. 29, n. 1, p. 17-24, 2015.

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

CINES, D. B. et al. Heparin-induced thrombocytopenia: an autoimmune disorder regulated through dynamic autoantigen assembly/disassembly. **J Clin Apher.**, v. 22, n. 1, p. 31-6, 2007.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed Pharmacother.**, v. 64, n. 1, p. 21-8, 2010.

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

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

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

ECLINPATH – *Cornell University College of Veterinary Medicine*. Disponível em: <http://eclinpath.com/>. Acesso em: 20 jul. 2019.

ESTEVEZ, B.; DU, X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling.

Physiology (Bethesda), v. 32, n. 2, p. 162-177, 2017.

EZIHE-EJIOFOR, J. A.; HUTCHINSON, N. Anticlotting mechanisms I: Physiology and pathology. **Contin Educ Anesth Crit Care Pain.**, v. 13, n. 3, p. 87-92, 2013.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.32, n.5, p. 416-21, 2010.

FLATO, U. A. P. et al. Novos anticoagulantes em cuidados intensivos. **Rev. Bras. Ter. intensiva**, v.23, n.1, p. 68-77, 2011.

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

FOLKES, A. J. et al. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. **J Med Chem.**, v. 51, n. 18, p. 5522-32, 2008.

FOSTER, C. J. et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. **J Clin Invest.**, v. 107, n. 12, p. 1591-98, 2001.

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

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 2, p. 3219-28, 1980.

GAWAZ, M.; VOGEL, S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. **Blood**, v. 122, n. 15, p. 2550-54, 2013.

GERWICK, W. H. et al. Stypotriol and stypoldione – ichthyotoxins of mixed biogenesis from the marine alga *Stypodium zonale*. **Tetrahedron Lett**, v. 20, n. 2, p. 145-148, 1979.

GERWICK, W. H.; FENICAL, W. Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical brown alga, *Stypodium zonale*. **J Org Chem**, v. 46, n. 1, p. 22-27, 1981.

GHIGO, A. et al. Therapeutic applications of PI3K inhibitors in cardiovascular diseases. **Future Med Chem.**, v. 5, n. 4, p. 479-92, 2013.

GILIO, K. et al. Non-redundant Roles of Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms α and β in Glycoprotein VI-induced Platelet Signaling and Thrombus Formation. **J Biol Chem.**, v. 284, n. 09, p. 33750-62, 2009.

GITZ, E. et al. Platelet interaction with von Willebrand factor is enhanced by shear-induced clustering of glycoprotein Ib α . **Haematologica.**, v. 98, n. 11, p. 1810-8, 2013.

HARRISON, P. et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. **Br J Haematol.**, v. 155, n. 1, p. 30-44, 2011.

HINKE, R. K. **Avaliação da atividade de compostos naturais e sintéticos sobre a hemostasia humana.** 2016. 58 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia). UFSC. Florianópolis, SC, 2016.

HOFFBRAND A.V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia.** 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 454 p.

IRFAN, M. et al. Eisenia bicyclis (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P₂Y₁₂ receptor signaling pathway. **Phytomedicine.**, v. 40, p. 79-87, 2018.

JANKU, F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. **Cancer Treat Rev.**, v. 59, p. 93-101, 2017.

JENNE, C. N.; URRUTIA, R.; KUBES, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **Int J Lab Hematol.**, v. 35, n. 3, p. 254-61, 2013.

JENNINGS, L. K. Role of platelets in atherothrombosis. **Am J Cardiol.**, v. 103, n. 3, p. 4A-10A, 2009.

JIN, J.; KUNAPULI, S. P. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, n. 14, p. 8070-4, 1998.

JOBLING, L.; EYRE, L. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia**

and intensive care medicine, v. 14, n. 2, p.51-53, 2013.

JUNG, H. A. et al. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Food Chem Toxicol**, v. 59, p. 199–206, 2013.

KAHN, M. L. et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. **J Clin Invest.**, v. 103, n. 6, p. 879-87, 1999.

KAZMI, R. S.; BOYCE, S.; LWALEED, B. A. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. **Semin Thromb Hemost.**, v. 41, n. 6, p. 549-55, 2015.

KIM, K. N. et al. In vitro cytotoxic activity of *Sargassum thunbergii* and *Dictyopteris divaricata* (Jeju Seaweeds) on the HL-60 tumour cell line. **Int J Pharmacol**, v. 5, p. 298–306, 2009.

KOLTAI, K. et al. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. **Int J Mol Sci.**, v. 18, n. 8, 2017.

KOUPENOVA, M. et al. Thrombosis and platelets: an update. **European Heart Journal**, v. 38, n. 11, p. 785-791, 2017.

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, 2009.

KÜTZING, F. T. (1859). *Tabulae phycologicae*; oder, Abbildungen der Tange. Vol. IX [9] pp. i-vii, 1-42, 100 pls. Nordhausen: Gedruckt auf kosten des Verfassers (in commission bei W. Köhne).

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**, v. 25, n. 1, p. 39-46, 2003.

LEE, S. et al. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. **Arch Pharm Res**, v. 26, p. 719–722, 2003.

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

LISMAN, T. et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. **Hepatology.**, v. 44, n. 1, p. 53-61, 2006.

LIU, Y. et al. Recent development of ATP-competitive small molecule phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors as anticancer agents. **Oncotarget.**, v. 8, n. 4, p. 7181-7200, 2017.

LUGASSY, G. et al. **Thrombosis and antithrombotic therapy.** 1° ed. Editora Taylor & Francis USA, 280 p., 2001.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 914-918, 2008.

MACOR, J. E. **Annual reports in medicinal chemistry.** 44^a ed. Wallingford: Elsevier, 2009.

MADAN, M.; BERKOWITZ, S. D.; TCHENG, J. E. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. **Circulation.**, v. 98, n. 23, p. 2629-35, 1998.

MANCUSO, M. E.; SANTAGOSTINO, E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. **Br J Haematol.**, v. 178, n. 2, p. 209-19, 2017.

MARGULIS, L.; CHAPMAN, M. **Kingdoms and Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth.** 1° ed. Academic Press, 2009.

MARKOWICZ-PIASECKA, M. et al. Biocompatibility Studies of Gadolinium Complexes with Iminodiacetic Acid Derivatives. **Biol Trace Elem Res.**, v. 189, n. 2, p. 426-36, 2019.

MARQUES, P. A. C.; PIERIN A. M. G. Fatores que Influenciam a Adesão de Pacientes com Câncer à Terapia Antineoplásica Oral. **Acta Paul Enferm**, v. 21, n. 2, p. 323-9, 2008.

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

MAYER, A. M. S. et al. Phospholipase A 2 inhibitors from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 260/261, n. 1, p. 521-529, 1993.

MENDES, G. et al. In vitro anti-HMPV activity of meroditerpenoids from marine alga *Styopodium zonale* (Dictyotales). **Molecules.**, v. 16, n. 10, p. 8437-50, 2011.

MENG, X. Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des.**, v. 7, n. 2, p. 146-57, 2011.

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.**, v. 23, n. 3, p. 605-15, 2018.

MOURA, L. A. et al. Antiplatelet and Anticoagulant Effects of Diterpenes Isolated from the Marine Alga, *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**, 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. **Marine Drugs**, v. 0, n. 8, p.1346-1358, 2011.

MURAMAKI, M. et al. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. **Prog Lipid Res.**, v. 50, n. 2, p. 152-92, 2011.

NEWMAN, D. J. CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.

O'BRIEN, E. T.; JACOBS, R. S.; WILSON, L. Inhibition of bovine brain microtubule assembly in vitro by stypoldione. **Mol Pharmacol.**, v. 24, n. 3, p. 493-99, 1983.

O'BRIEN, E. T. et al. Pharmacological properties of a marine natural product, stypoldione, obtained from the brown alga *Styopodium zonale*. **Hydrobiologia**, v. 116/117, n. 1, p. 141-145, 1984.

O'BRIEN, E. T. et al. Mechanism of Action of the Marine Natural Product Stypoldione: Evidence for Reaction with Sulfhydryl Groups. **J. Med. Chem.**, v. 29, p. 1851-55, 1986.

O'BRIEN, E. T et al. Selective inhibition of cytokinesis in sea urchin embryos by low concentrations of stypoldione, a marine natural product that reacts with sulfhydryl groups. **Mol Pharmacol.**, v. 35, n. 5, p. 635-642,1989.

OLIVEIRA FILHO, E. C. & FURTADO, R.P. (1978). *Dictyopteris jolyana* sp. nova (Phaeophyta) from Brazil. *Nova Hedwigia* 29: 759-763.

Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial da Saúde – OPAS/OMS. **Doenças cardiovasculares**. Brasil, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doen-cas-cardiovasculares&Itemid=1096. Acesso em: 21 mar. 2019.

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth.**, v. 58, n. 5, p. 515-523, 2014.

PAPENFUSS, G.F. Notes on South African marine algae. I Botaniska Notiser, p. 200-226, 1940.

PARK, M. S. et al. Thromboelastography as a Better Indicator of Postinjury Hypercoagulable State Than Prothrombin Time or Activated Partial Thromboplastin Time. **J Trauma**, v. 67, n. 02, p. 266-276, 2009.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, 2004.

QUACH, N. D.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. **Biochem Pharmacol.**, v. 90, n. 4, p. 338-48, 2014.

QURESHI, A. H. et al. Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. 1-16, 2009.

RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.**, v. 6, n. 2, p. 147-172, 2016.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Marine biotechnology for production of food ingredients. **Adv Food Nutr Res.**, v. 52, p. 237-92, 2007.

RUOCCO, N. et al. Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential. **Molecules Rev**, v. 21, n. 5, 2016.

SCHWARTZ, U. R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 1153-1161, 2001.

SEBAUGH, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharm Stat.**, v. 10, n. 2, p. 128-34, 2011.

SERRALVO, F. D.; ZAMBOTI, J. L.; BREGANO, J. W. Variabilidade nos resultados de INR (*International Normalized Ratio*): comparação de seis marcas comerciais de tromboplastina. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 01, p. 225-232, 2015.

SHENKMAN, B. et al. Variable responsiveness to clopidogrel and aspirin among patients with acute coronary syndrome as assessed by platelet functions tests. **Thromb Res.**, v. 122, p. 336-45, 2008.

SHIKDAR, S.; BHATTACHARYA, P. T. **International Normalized Ratio (INR)**. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507707/>.

SHIMONAKA, M. et al. Successive study on the production of plasminogen activator in cultured endothelial cells by phytosterol. **Thromb Res.**, v. 36, n. 3, p. 217-222, 1984.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Análise do Impacto Econômico das Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017.

SIRA, J.; EYRE, L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v. 17, n. 2, p. 79-82, 2016.

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

SOARES, A. R. et al. In vitro antiviral effect of meroditerpenes isolated from the Brazilian seaweed *Styopodium zonale* (Dictyotales). **Planta Med.**, v. 73, n. 11, p. 1221-4, 2007.

SOARES, A. R. et al. Intraspecific variation of meroditerpenoids in the brown alga *Styopodium zonale* guiding the isolation of new compounds. **Rev. bras. farmacogn.**, v.25, n.6, p. 627-33, 2015.

SOUZA, T. M. et al. The alkaloid 4-methylaaptamine isolated from the sponge *Aaptos aaptos* impairs Herpes simplex virus type 1 penetration and immediate-early protein synthesis. **Planta Med.**, v. 73, n. 3, p. 200-205, 2007.

SPIESS, B. D. Treating Heparin Resistance With Antithrombin or Fresh Frozen Plasma. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 85, n. 6, p. 2153-60, 2008.

STALKER, T. J. et al. Platelet Signaling. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 210, p. 59-85, 2012.

STARK, A. K. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 23, p. 82-91, 2015.

SYRACUSE, S. M. **Avaliação do efeito de compostos isolados da alga marinha *Dictyopteris jolyana* sobre a agregação plaquetária.** 2018. 80 p. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia. UFSC. Florianópolis, SC, 2018.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista virtual de química**, 2013. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/346>. Acesso em: 15 jun. 2019.

TENNANT, J. R. Evaluation of the Trypan Blue technique for determination of cell viability. **Transplantation.**, v. 2, p. 685-94, 1964.

THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. **Thromb Haemost.**, v. 114, n. 3, p. 449-458, 2015.

TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature.**, v. 387, n. 6634, p. 673-6, 1997.

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

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem.**, v. 31, n. 2, p. 455-61, 2010.

VALLIM, M. A. et al. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the

Tropical Atlantic American region. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1-16, 2005.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem.**, v. 45, n. 12, p. 2615-23, 2002.

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

WANG, J. et al. Human endometrial stromal stem cells differentiate into megakaryocytes with the ability to produce functional platelets. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 1-9, 2012.

WANG, Y.; GALLANT, R. C.; NI, H. Extracellular matrix proteins in the regulation of thrombus formation. **Curr Opin Hematol.**, v. 23, n. 3, p. 280-7, 2016.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural Simplification of Natural Products. **Chem. Rev.**, v. 119, n. 6, 2019.

WEITZ, J. I., LINKINS, L. A. Beyond heparin and warfarin: the new generation of anticoagulants. **Expert Opin Investig Drugs.**, v. 16, p. 271-82, 2007.

WHITE, S. J.; JACOBS, R. S. Effect of stypoldione on cell cycle progression, DNA and protein synthesis, and cell division in cultured sea urchin embryos. **Mol Pharmacol.**, v. 24, n. 3, p. 500-8, 1983.

WI, Y. I. Modulation of platelet activation and thrombus formation using a pan-PI3K inhibitor S14161. **PLoS One.**, v. 9, n. 8, 2014.

WIJEYERATNE, Y. D.; HEPTINSTALL, S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. **Br J Clin Pharmacol**, v. 72, n. 4, p. 647-657, 2011.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological Activities and Potential Health Benefits of Sulfated Polysaccharides Derived from Marine Algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14-21, 2011.

YOO, M. S. Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines

via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW 264.7 macrophages. **Food Chem**, v. 135, p. 967–975, 2012.

YUN, S. H. et al. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-5, 2016.

ZAPATA, J. C.; COX, D.; SALVATO, M. S. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1-12, 2014.

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 à trombofilia em indivíduos adultos saudáveis e em pessoas com história clínica e familiar de trombofilia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9208 **Fax:** (48)3721-9698 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 631.351

Senhor(a) tenho o mínimo de desconforto. Apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe da pesquisa tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. A entrevista para a coleta de algumas informações (uso de medicamentos, realização de exercícios físicos e histórico familiar) será realizada em ambiente tranquilo e discreto, sempre respeitando a individualidade e as necessidades de cada paciente. Será assegurado o direito a não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados retirados do prontuário médico serão armazenados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

Benefícios:

Os participantes talvez não tenham benefício imediato com o estudo, entretanto com a conclusão desse trabalho será determinada a prevalência das anormalidades que predisõem a 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 CEP SH UFSC Relatório, Projeto, Declaração Instituição, TCLE, Cronograma, Folha de Rosto

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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)3721-9208	Fax: (48)3721-9698	E-mail: cep@reitoria.ufsc.br	