



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

Bruna Jaques

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DO COMPOSTO
MENZOQUINONA ISOLADO DA ALGA PARDA *Desmarestia menziesii***

Florianópolis

2020

Bruna Jaques

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DO COMPOSTO
MENZOQUINONA ISOLADO DA ALGA PARDA *Desmarestia menziesii***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título 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.

Jaques, Bruna
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DO COMPOSTO
MENZOQUINONA ISOLADO DA ALGA PARDA *Desmarestia menziesii* /
Bruna Jaques ; orientador, Ana Carolina Rabello de
Moraes, 2020.
79 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. antiagregante. 3. *Desmarestia menziesii*. 4. menzoquinona. 5. epinefrina. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Bruna Jaques

Avaliação da atividade antitrombótica do composto menzoquinona isolado da alga parda *Desmarestia menziesii*

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

Prof.(a) Lílian Sibelle Campos Bernardes, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. David Cavalcanti Ferreira, Dr.
Instituição Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago

Prof.(a) Iara Kretzer, Dr.(a)
Instituição 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.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Nelza, por ser minha maior incentivadora, por torcer por mim e vibrar comigo a cada conquista. Te amo, princesa. Também gostaria de agradecer ao meu pai Almir, que desde os dez anos de idade trabalha incansavelmente para cuidar da família. Pai, você é meu maior exemplo de força e integridade. Eu jamais teria realizado esse sonho (e tantos outros) sem o apoio incondicional de vocês.

Ao meu sobrinho Pedro, por despertar em mim a vontade de sempre ser uma pessoa melhor. Eu te amo com todo meu coração!

À minha grande amiga/irmã Larissa, por mostrar que a vida é boa e que com amor tudo fica mais fácil.

A toda minha família, por cuidarem uns dos outros.

À minha orientadora, Professora Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes, por sua generosidade, dedicação e apoio em tempo integral. Com profunda admiração gostaria de te agradecer por esta oportunidade e por todo conhecimento transmitido. Foi uma honra aprender com você!

A Tanara, cujo apoio e companheirismo foram essenciais durante o período de realização deste trabalho. Obrigada por dividir comigo dúvidas, anseios e frustrações, mas acima de tudo, obrigada por somar conhecimentos e alegrias. Estendo meus agradecimentos às minhas colegas Bianca, Carine e Stephanie, por todo apoio e auxílio para a concretização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, pelo auxílio na realização dos experimentos. À Professora Dra. Maria Cláudia Santos da Silva, pela disponibilidade do laboratório para que os experimentos fossem realizados.

Aos colaboradores do banco de sangue do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago pela disponibilidade na coleta das amostras dos doadores.

À Professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg e a doutoranda Ana Cláudia Philippus, pela colaboração, fornecendo o composto testado nesse trabalho. Agradeço a parceria e disponibilidade de sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo subsídio financeiro à pesquisa.

Este trabalho não existiria sem a ajuda de todos vocês.

“A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”.

João Guimarães Rosa

RESUMO

Eventos tromboembólicos são responsáveis por uma alta incidência de morbimortalidade em todo o mundo. O tratamento e a prevenção destes eventos envolvem o uso de medicamentos antiagregantes e/ou anticoagulantes. No entanto, os fármacos atualmente disponíveis possuem limitações associadas, como risco aumentado de sangramento e variabilidade interpessoal de resposta, o que limitam o seu uso. Neste contexto, a busca por novas moléculas é crescente e o ambiente marinho, por ser uma fonte rica e ainda pouco explorada de organismos, tem se tornado alvo de pesquisas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do composto menzoquinona, isolado a partir da alga parda *Desmarestia menziesii*, sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana. A atividade sobre a coagulação foi avaliada pelos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). O efeito sobre a agregação plaquetária foi analisado por turbidimetria utilizando difosfato de adenosina (ADP), epinefrina e colágeno como agonistas. A menzoquinona (500 μM) não apresentou atividade anticoagulante significativa. No entanto, inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados, sendo capaz de reverter parcialmente a segunda onda de agregação induzida por ADP e colágeno e parcialmente a primeira onda induzida por epinefrina. Os perfis das curvas de agregação sugerem que o efeito inibitório do composto esteja relacionado a uma inibição de vias de sinalização dependentes da proteína Gi. O efeito antiagregante da menzoquinona é concentração dependente, no entanto, não é dependente do tempo de incubação. As melhores CI_{50} obtidas foram de $54,8 \pm 2,1 \mu\text{M}$ frente à epinefrina e de $426,9 \pm 18,4 \mu\text{M}$ frente ao colágeno. O efeito do composto menzoquinona sobre a ativação plaquetária foi avaliado por citometria de fluxo por meio da expressão membranar de P-selectina e de GpIIb/IIIa ativada. O composto não foi capaz de inibir a expressão dos marcadores quando avaliado na sua menor CI_{50} (54,8 μM), no entanto, inibiu em 100% a expressão destes na sua maior concentração (500 μM). O efeito citotóxico da menzoquinona foi avaliado pelo teste de hemólise e pela análise da viabilidade plaquetária pelo método de exclusão por azul de trypan. O composto provocou pequena hemólise em concentrações de até três vezes sua menor CI_{50} e não foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade plaquetária. Estudos *in silico* foram realizados para prever a toxicidade, a biodisponibilidade oral e o potencial do composto vir a se tornar um novo fármaco. A predição teórica de toxicidade sugere que o composto apresenta baixo risco toxicológico em todos os parâmetros analisados: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritativos e efeito negativo sobre a reprodução. Os parâmetros preditivos relacionados ao potencial do composto menzoquinona vir a se tornar um fármaco não foram favoráveis, no entanto, são semelhantes ao do antiagregante comercializado ácido acetilsalicílico. Segundo a regra dos cinco de Lipinski, sugere-se que a menzoquinona tem potencial para apresentar boa biodisponibilidade oral. A compilação dos resultados evidencia a potencial utilização do composto menzoquinona como protótipo no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

Palavras-chave: antiagregante. *Desmarestia menziesii*. menzoquinona. epinefrina.

Antithrombotic activity of a compound isolated from brown algae *Desmarestia menziesii*

Thromboembolic events are responsible for a high incidence of morbidity and mortality worldwide. The treatment and prevention of these events involve the use of antiplatelet and/or anticoagulant. However, currently available medicines have limitations, such as increased risk of bleeding and interpersonal response variability, which limit their use. In this context, the search for new molecules is growing and the marine environment, for being a rich and still poorly explored source of organisms, has been targeted. The aim of this study was to evaluate the effect of the compound menzoquinone, isolated from the brown algae *Desmarestia menziesii*, on platelet aggregation and human blood clotting. Coagulation activity was assessed by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) tests. The effect on platelet aggregation was analyzed by turbidimetry using adenosine diphosphate (ADP), epinephrine and collagen as agonists. Menzoquinone (500 μM) did not present significant anticoagulant activity. However, it significantly inhibited platelet aggregation induced by all tested agonists, being able to partially reverse the second wave of aggregation induced by ADP and collagen and partially the first wave induced by epinephrine. The aggregation curves profiles suggest that the inhibitory effect of the compound is related to an inhibition of protein Gi-dependent signaling pathways. The antiplatelet effect of menzoquinone was concentration-dependent; however, it was not dependent of the incubation time. The better IC_{50} obtained was $54.8 \pm 2.1 \mu\text{M}$ when epinephrine as agonist was used, and $426.9 \pm 18.4 \mu\text{M}$ when collagen was used. The menzoquinone effect on platelet activation was assessed by flow cytometry through membrane expression of P-selectine and activated GpIIb/IIIa. The compound was not able to inhibit the P-selectine and GpIIb/IIIa expression when evaluated at its better IC_{50} (54.8 μM), however, inhibited 100% of their expression at its highest concentration (500 μM). The menzoquinone cytotoxic effect was evaluated by the hemolysis test and by the analysis of platelet viability using the trypan blue exclusion method. The compound caused small hemolysis at concentrations up to three times its better IC_{50} and do not significantly reduced platelet viability. In silico studies were carried out to predict toxicity, oral bioavailability and the potential of the compound to become a new medicine. The theoretical prediction of toxicity suggests that the compound presents low toxicological risk in all parameters analyzed: mutagenicity, tumorigenicity, irritative effects and negative effect on reproduction. The predictive parameters related to the potential of the compound menzoquinone to become a drug were not favorable, however, it was similar to the antiplatelet medicine aspirin. According to Lipinski's rule of five, it is suggested that menzoquinone has the potential to present good oral bioavailability. The compilation of the results shows the potential use of the compound menzoquinone as a prototype in the development of new antithrombotic drugs.

Keywords: antiplatelet. *Desmarestia menziesii*. menzoquinone. epinephrine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das plaquetas.....	24
Figura 2 – Vias de adesão plaquetária	25
Figura 3 – Interação entre os agonistas plaquetários e seus respectivos receptores na superfície da plaqueta.....	26
Figura 4 – Ligação entre plaquetas durante o processo de agregação.....	29
Figura 5 – Representação do modelo clássico da cascata de coagulação.....	31
Figura 6 – Estrutura da menzoquinona isolada da alga parda <i>Desmarestia menziesii</i>	39
Figura 7 – Representação da curva de agregação plaquetária	40
Figura 8 – Efeito do Composto 1 (500 μ M) sobre os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada.....	46
Figura 9 – Efeito do Composto 1 (500 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (10 μ M), epinefrina (5 μ g/mL) e colágeno (10 μ g/mL).....	47
Figura 10 – Imagem ilustrativa do efeito do Composto 1 sobre o perfil de agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP – 10 μ M), epinefrina (EPI - 5 μ g/mL) e colágeno (COL - 2 μ g/mL).....	48
Figura 11 – Efeito antiagregante do Composto 1 (500 μ M) em relação a diferentes períodos de incubação (5 e 10 minutos).....	49
Figura 12 – Efeito do Composto 1 (500 μ M) sobre a viabilidade plaquetária	50
Figura 13 – Curva de concentração-resposta do Composto 1 em relação a agregação induzida por epinefrina(5 μ g/mL) e por colágeno (2 μ g/mL).....	51
Figura 14 – Efeito do Composto 1 sobre a expressão membranar de GpIIb/IIIa (PAC-1) e de P-selectina (CD62P) em plaquetas estimuladas por epinefrina.....	53
Figura 15 – Hemocompatibilidade do Composto 1	54
Figura 16 – Estudo teórico de toxicidade do Composto 1	55

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo da porcentagem de plaquetas impregnadas com corantes (não viáveis)	42
Equação 2 – Cálculo da porcentagem de inibição a partir da intensidade de fluorescência média	44
Equação 3 – Cálculo da taxa de hemólise	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória de 50% (CI ₅₀) do Composto 1	51
Tabela 2 – Porcentagem de inibição da expressão de GpIIb/IIIa (PAC-1) e de P-selectina (CD62P).....	52
Tabela 3 – Predição teórica do potencial do Composto 1 se tornar um fármaco	56
Tabela 4 – Propriedades físicoquímicas do Composto 1	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAS - Ácido acetilsalicílico
- ADP - Difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)
- AP4 - Menzoquinona isolada da alga parda *Desmarestia menziesii*
- ATP - Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
- AVC – Acidente vascular cerebral
- cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)
- CI50 - Concentração inibitória de 50%
- COL - Colágeno
- COX-1 - Ciclooxigenase 1
- DAG - Diacilglicerol
- DCV - Doenças cardiovasculares
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DOACs - Anticoagulantes orais diretos
- EPI - Epinefrina
- FSC - Ângulo de dispersão frontal (do inglês *forward scatter*)
- FT - Fator tecidual
- FvW - Fator de von Willebrand
- Gp - Glicoproteína
- GPCR - Receptor acoplado à proteína G
- GTP - Trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)
- HU/UFSC/EBSERH - Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
- IFM - Intensidade de fluorescência média
- IP3 - Trifosfato de inositol
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PBS - Tampão fosfato-salino
- PI3K β - Fosfoinositídeo 3 quinase beta
- PIP2 - Fosfatidilinositol 4-bifosfato
- PKC - Proteína quinase C
- PLA2 - Fosfolipase A2
- PLC β - Fosfolipase C beta
- PLC γ 2 - Fosfolipase C γ 2

PN - Produtos naturais

PPP- Plasma pobre em plaquetas

PRP - Plasma rico em plaquetas

RMN - Ressonância magnética nuclear

SSC - Ângulo de dispersão lateral (do inglês *side scatter*)

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TEV - Tromboembolismo venoso

TP - Tempo de protrombina

TPA - Ativador tecidual do plasminogênio

TTPa - Tempo de tromboplastina parcial ativada

TXA₂ - Tromboxano A₂

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

uPA - Ativador do plasminogênio tipo uroquinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	HEMOSTASIA	23
3.2	HEMOSTASIA PRIMÁRIA.....	23
3.2.1	Adesão.....	25
3.2.2	Ativação.....	25
3.2.3	Secreção.....	28
3.2.4	Agregação.....	29
3.3	HEMOSTASIA SECUNDÁRIA	29
3.4	FIBRINÓLISE.....	31
3.5	DISTÚRBIOS DA HEMOSTASIA	32
3.6	TERAPIA ANTITROMBÓTICA	33
3.7	PRODUTOS NATURAIS.....	36
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA	38
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	38
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS	38
4.3	MENZOQUINONA	38
4.4	ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	39
4.5	ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	40
4.5.1	Avaliação da atividade frente ao tempo de incubação	41
4.5.2	Determinação da Concentração Inibitória 50%.....	41
4.6	TESTE DE VIABILIDADE PLAQUETÁRIA.....	42

4.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa E DE P-SELECTINA	42
4.8	TESTE DE HEMÓLISE	44
4.9	PREDIÇÃO TEÓRICA DA BIODISPONIBILIDADE ORAL, DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL DO COMPOSTO VIR A SE TORNAR UM NOVO FÁRMACO.....	45
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE A COAGULAÇÃO.....	46
5.2	EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE A AGREGAÇÃO.....	46
5.2.1	Avaliação da atividade do Composto 1 frente ao tempo de incubação	48
5.3	EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE A VIABILIDADE PLAQUETÁRIA.....	50
5.4	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50%.....	51
5.5	EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa E DE P-SELECTINA.....	52
5.6	EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE AS HEMÁCIAS.....	54
5.7	ESTUDOS <i>IN SILICO</i> DO COMPOSTO 1	54
5.7.1	Predição teórica de toxicidade.....	54
5.7.2	Predição teórica do potencial do Composto 1 de se tornar um fármaco.....	55
5.7.3	Predição teórica da biodisponibilidade oral	56
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	66
8	PERSPECTIVAS.....	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Seres Humanos	76
	ANEXO B – Trabalhos Apresentados em Congressos	79

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são atualmente a principal causa de mortes no mundo (WHO, 2018). O bloqueio do fluxo sanguíneo desencadeado pela formação de trombos representa um papel fundamental na etiologia desta classe de doenças. A formação de um trombo pode ser estimulada por uma lesão vascular ou por condições patológicas, de qualquer forma, independente do estímulo, ocorrerá ativação e agregação de plaquetas e também aumento da atividade dos fatores de coagulação. Neste contexto, medicamentos antiagregantes e anticoagulantes são os de escolha para o tratamento e para a prevenção secundária de eventos cardiovasculares (GOTO; TOMITA, 2013).

Dentre os diversos medicamentos antitrombóticos atualmente disponíveis, o antiagregante ácido acetilsalicílico (AAS) e o anticoagulante varfarina são os que possuem o maior conjunto de evidências clínicas de eficácia e segurança, e, portanto, são os mais utilizados (GOTO; TOMITA, 2013). Estudos evidenciaram que o uso isolado de AAS diminui em até 25% a mortalidade por acidente vascular cerebral (AVC) e por infarto agudo do miocárdio (BMJ, 2002; GUIRGUIS-BLAKE *et al.*, 2016). No entanto, apesar de eficaz, o uso contínuo de AAS está relacionado a um risco aumentado de sangramento grave, distúrbios gastrointestinais e variabilidade interpessoal de resposta (RICHMAN; OWENS, 2017; TANTRY *et al.*, 2018). Com relação a varfarina, este fármaco é o mais utilizado no tratamento de pacientes com tromboembolismo venoso e na prevenção de AVC em pacientes com fibrilação atrial (FEITOSA *et al.*, 2018; GOTO; TOMITA, 2013), porém, seu uso também está relacionado a ocorrência de sangramentos graves, além de outros obstáculos, pois ele possui janela terapêutica estreita e apresenta importantes interações medicamentosas e dietéticas (MEGA; SIMON, 2015).

Como observado, os medicamentos antitrombóticos podem provocar eventos adversos leves ou até mesmo graves que limitam seu uso no contexto clínico. Por isso, é crescente a busca por novas moléculas que possuam efeito antiagregante e/ou anticoagulante satisfatório, mas que também sejam seguras para os usuários. O ambiente marinho é um potencial candidato para isto, uma vez que seus organismos são responsáveis pela produção de uma quantidade inesgotável de metabolitos secundários (MALVE, 2016). Estes, por sua vez, muitas vezes são utilizados como protótipos na síntese de novas moléculas candidatas ao

desenvolvimento de um novo fármaco. Atualmente, estima-se que mais de 50% dos medicamentos comercializados sejam de origem natural ou baseados em moléculas de origem natural (KATZ; BALTZ, 2016; MARTINS *et al.*, 2014). Assim, o objetivo geral do presente estudo é verificar o efeito de um composto isolado da alga marinha parda *Desmarestia menziesii* sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da menzoquinona isolada da alga parda *Desmarestia menziesii* sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana, com o intuito de identificar uma nova molécula com atividade antitrombótica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da menzoquinona sobre o tempo de protrombina (TP) e tempo de trombolastina parcial ativada (TTPa);
- Avaliar o efeito da menzoquinona sobre a agregação plaquetária, utilizando difosfato de adenosina (ADP), epinefrina e colágeno como agonistas;
- Avaliar o efeito do tratamento com menzoquinona sobre os perfis das curvas de agregação plaquetária;
- Avaliar se a atividade da menzoquinona é dependente do tempo de incubação;
- Avaliar o efeito da menzoquinona sobre a viabilidade das plaquetas;
- Determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) da menzoquinona frente à agregação plaquetária;
- Avaliar o efeito da menzoquinona sobre a expressão membranar da GpIIb/IIIa ativada e de P-selectina;
- Verificar se a menzoquinona induz hemólise de eritrócitos humanos de indivíduos saudáveis;

- Avaliar parâmetros teóricos preditivos de biodisponibilidade oral, de toxicidade e do potencial do composto menzoquinona se tornar um novo fármaco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico cuja finalidade é garantir um estado sanguíneo fluído, evitando a perda de sangue pelos vasos sanguíneos e a formação de trombos indevidos no mesmo (LORENZI, 2006). Para isto, é necessário um balanço entre substâncias pró-coagulantes e anticoagulantes, além de um sistema fibrinolítico atuante. O processo da hemostasia pode ser didaticamente dividido em três etapas: hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

A hemostasia primária envolve a interação entre as plaquetas e os vasos sanguíneos. Após injúria vascular, as plaquetas se aderem ao local da lesão e umas às outras, formando um tampão plaquetário primário e bloqueando a perda de sangue. De forma simultânea, ocorre a hemostasia secundária, que consiste na formação de uma rede de fibrina por meio de uma reação proteolítica sequencial dos fatores de coagulação. A fibrina formada é depositada por entre o tampão plaquetário, estabilizando-o e formando um coágulo insolúvel que irá permanecer no local da lesão até reparação total do dano vascular. Por fim, ocorre a etapa de fibrinólise, que se refere à dissolução do coágulo formado, reestabelecendo assim a fluidez dentro do vaso sanguíneo (GALE, 2011).

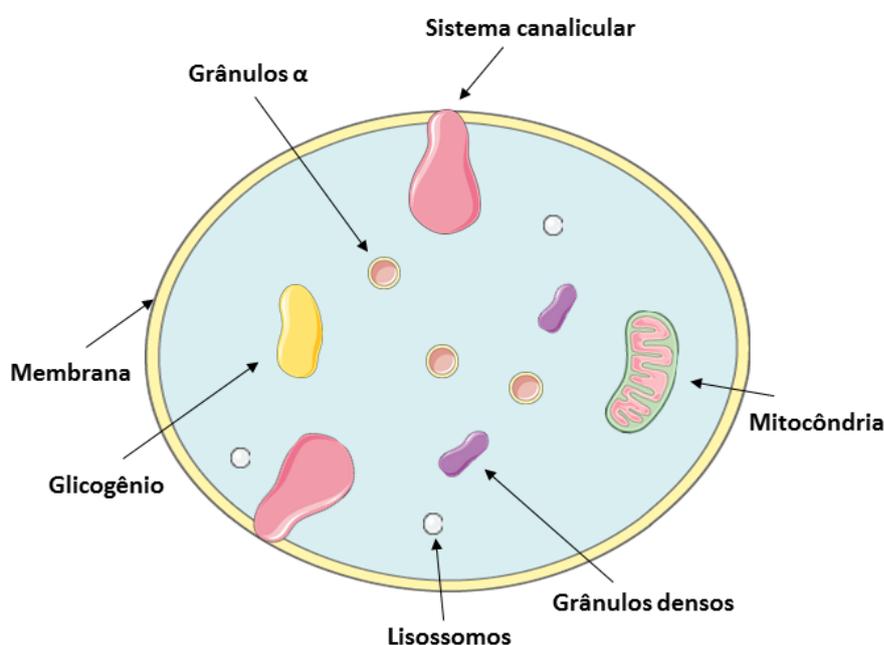
Alterações nos processos acima mencionados podem ocasionar tanto eventos hemorrágicos, quanto trombóticos (LORENZI, 2006).

3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA

As plaquetas são células anucleadas derivadas da fragmentação citoplasmática de megacariócitos. Sua vida média no sangue periférico é de 8 a 10 dias e seus valores fisiológicos estão entre $150\text{--}400 \times 10^3$ plaquetas por microlitros de sangue (HOFFBRAND; MOSS, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2012). Apesar de serem células anucleadas, possuem uma estrutura complexa, rica em constituintes importantes para a hemostasia (CASTRO *et al.*, 2006).

Com relação a sua estrutura, as plaquetas possuem três zonas principais: i) a zona periférica, constituída por um sistema canalicular aberto, glicoproteínas (Gp) de superfície, fosfolipídios e receptores acoplados a proteínas G (GPCR); ii) a zona sol-gel, formada pelo citoesqueleto, confere à plaqueta seu formato discoide; e iii) a zona das organelas, que contém grânulos plaquetários ricos em substâncias pró-agregantes, além de mitocôndrias e glicogênio, essenciais para o funcionamento das plaquetas (Figura 1) (CIMMINO; GOLINO, 2013; GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

Figura 1 - Estrutura das plaquetas.



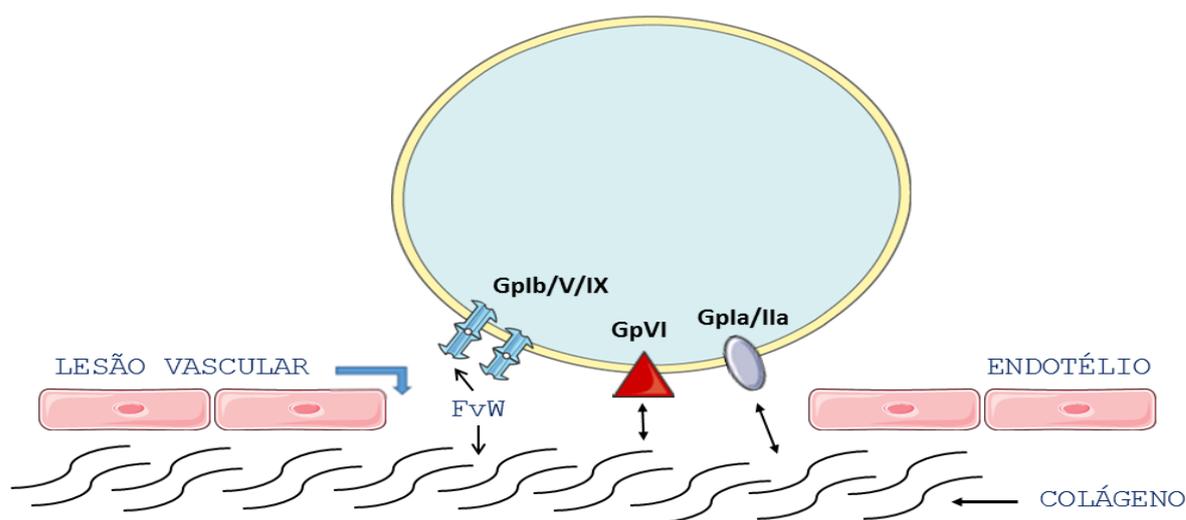
Fonte: A autora.

A principal função das plaquetas é a formação de um tampão plaquetário que bloqueie o sangramento em locais de injúria vascular (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017). Em situações fisiológicas, o endotélio vascular impede o contato das plaquetas com a parede do vaso sanguíneo por meio da produção de substâncias inibitórias como a prostaciclina e o óxido nítrico. No entanto, quando ocorre lesão tecidual, o endotélio danificado se torna reativo e expõe fatores pró-coagulantes que permitem a interação das plaquetas e sua subsequente adesão ao endotélio. Uma vez aderidas, as plaquetas são ativadas, seu conteúdo granular é secretado e elas se agregam, o que termina por formar um tampão plaquetário instável (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; GURNEY, 2016).

3.2.1 Adesão

A adesão das plaquetas ao endotélio lesado é a primeira etapa da hemostasia primária. Nesta etapa, as plaquetas circulantes vão se aderir ao tecido lesionado por meio da interação com substâncias presentes no componente subendotelial do vaso sanguíneo, como o colágeno e o fator de von Willebrand (FvW). O colágeno pode se ligar de duas formas à plaqueta: i) de forma direta, através da interação com as glicoproteínas GpVI e GpIa/IIa presentes na superfície plaquetária; ou ii) de forma indireta, por intermédio da ligação do FvW à porção Ib da GpIb/V/IX, formando uma ponte colágeno-FvW-plaquetas (Figura 2) (CIMMINO; GOLINO, 2013; HOU *et al.*, 2015).

Figura 2 - Vias de adesão plaquetária.



FvW – fator de von Willebrand; Gp – glicoproteína. Fonte: A autora.

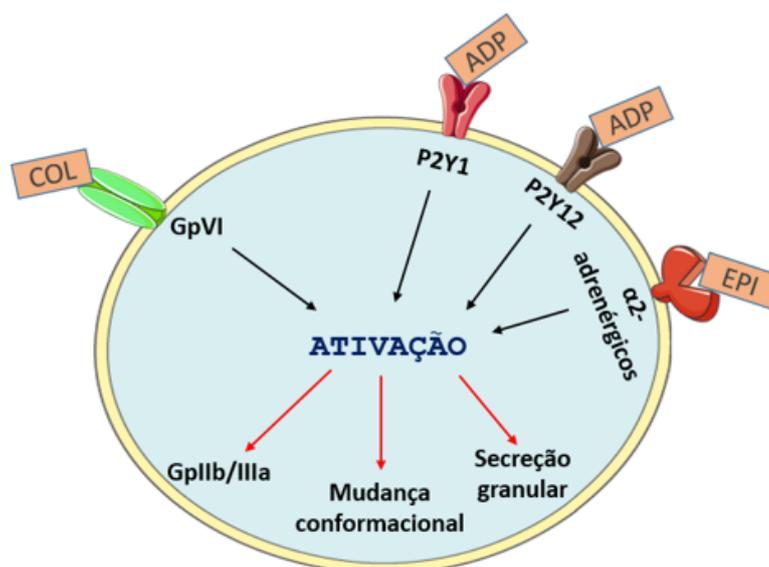
3.2.2 Ativação

O processo de adesão por si só desencadeia a ativação plaquetária (HOU *et al.*, 2015). Uma vez ativada, a plaqueta sofre reorganização do seu citoesqueleto, passando de sua forma discoide para um formato esférico, com emissão de pseudópodos, conferindo assim, uma maior área de contato com outras plaquetas. Além disto, ocorre secreção do seu conteúdo

granular e aumento da concentração intracelular de cálcio. Estes eventos culminam em uma mudança conformacional da glicoproteína GpIIb/IIIa, que passa do seu estado inativo para seu estado ativo (BERNDT; METHAROM; ANDREWS, 2014; GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014). A GpIIb/IIIa é a glicoproteína mais abundante nas plaquetas, representando 3% do seu total de proteínas, e é responsável pela interação entre plaquetas, ou seja, ela é responsável pela agregação plaquetária propriamente dita (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017).

Além da ativação produzida pelo processo de adesão, diversos agonistas também podem atuar como ativadores como, por exemplo, o ADP, a epinefrina e o colágeno. A ativação por meio destes agentes ocorre pela sua interação com receptores específicos presentes na superfície plaquetária (Figura 3) (KICKLER, 2006).

Figura 3 - Interação entre os agonistas plaquetários e seus respectivos receptores na superfície da plaqueta.



ADP – difosfato de adenosina; COL – colágeno; EPI – epinefrina. Fonte: A autora.

O ADP está presente nos grânulos densos de plaquetas que são secretados durante o processo de ativação plaquetária. Após sua secreção, o ADP atua por *feedback* retroativo, estimulando ainda mais a resposta de ativação. Existem dois receptores específicos para ADP na superfície das plaquetas, o P2Y1 e o P2Y12, sendo que para uma agregação completa, ambos receptores precisam ser estimulados (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017; HOFFBRAND; MOSS, 2018). O receptor P2Y1 é acoplado à proteína Gq e, quando estimulado por ADP, inicia o processo de ativação e agregação pela via da fosfolipase C beta

(PLC- β). Nessa via, a PLC- β hidrolisa o fosfatidilinositol 4-bifosfato (PIP₂), gerando trifosfato de inositol (IP₃). O IP₃ aumenta as concentrações intracelulares de cálcio, que resulta na conversão da forma das plaquetas de discoide para esférica e alteração conformacional da GpIIb/IIIa, transformando-a na sua forma ativa. Enquanto a estimulação do receptor P2Y₁ é capaz de apenas iniciar uma resposta de agregação, é a ativação do receptor P2Y₁₂ que provoca uma agregação estável e irreversível. O receptor P2Y₁₂, acoplado à proteína G_i, estimula a fosfoinositídeo 3 quinase beta (PI3K β) e regula negativamente a atividade da enzima adenilato-ciclase, resultando em uma mobilização ainda maior de cálcio, amplificando assim o sinal de agregação e promovendo a manutenção da conformação ativa da GpIIb/IIIa (BROOS *et al.*, 2011; FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017; RAND; ISRAELS, 2018).

Assim como o ADP, a epinefrina também é secretada de grânulos densos após ativação plaquetária (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017). Apesar de ser um agonista fraco, ela potencializa o processo de ativação das plaquetas por meio da sua interação com receptores adrenérgicos (ARDLIE; MCGUINNESS; GARRETT, 1985; WALLACE *et al.*, 1982). Estes receptores pertencem à família de GPCR e apresentam-se em dois subtipos: alfa (alfa-1 e alfa-2) e beta (beta-1 e beta-2), sendo que o subtipo α 2-adrenérgico é o que está presente na superfície das plaquetas. A interação de epinefrina com os α 2-adrenoreceptores inibe a formação de adenilato-ciclase via proteína G_i, o que resulta na diminuição da concentração de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). O cAMP é responsável por controlar as concentrações intracelulares de íons cálcio, portanto, sua inibição resultará em um aumento deste íon. Concentrações aumentadas de cálcio ativam a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), que irá hidrolisar fosfolipídios de plaquetas, resultando na liberação de ácido araquidônico. O ácido araquidônico funcionará como substrato para a formação de tromboxano A₂ (TXA₂), um importante agente agregante que provoca vasoconstrição e amplificação secundária da ativação plaquetária (BROOS *et al.*, 2011; FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017; RAND; ISRAELS, 2018).

Como descrito anteriormente, o colágeno está presente na matriz subendotelial e é exposto quando ocorre lesão tecidual, momento em que interage com as glicoproteínas plaquetárias GpVI e GpIa/IIa. Ao passo que a interação entre o colágeno e a GpIa/IIa tem papel mais importante na adesão das plaquetas, a sua interação com a GpVI promove a

ativação plaquetária. Isto ocorre porque a sua interação com a GpVI resulta na fosforilação de efetores intracelulares, como a fosfolipase $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$). A PLC $\gamma 2$ gera IP3 e diacilglicerol (DAG) a partir da hidrólise de PIP2. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), promovendo liberação de TXA2, e o IP3 aumenta as concentrações intracelulares de cálcio, culminando na ativação das plaquetas (ANDREWS *et al.*, 2004; MOLICA *et al.*, 2017; SURIN; BARTHWAL; DIKSHIT, 2007).

3.2.3 Secreção

A consequente reorganização do citoesqueleto devido à ativação plaquetária permite que os grânulos presentes nas plaquetas entrem em contato com o sistema canalicular aberto e liberem seu conteúdo granular, rico em substâncias pró-agregantes. O resultado final deste processo é a amplificação da ativação plaquetária (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017).

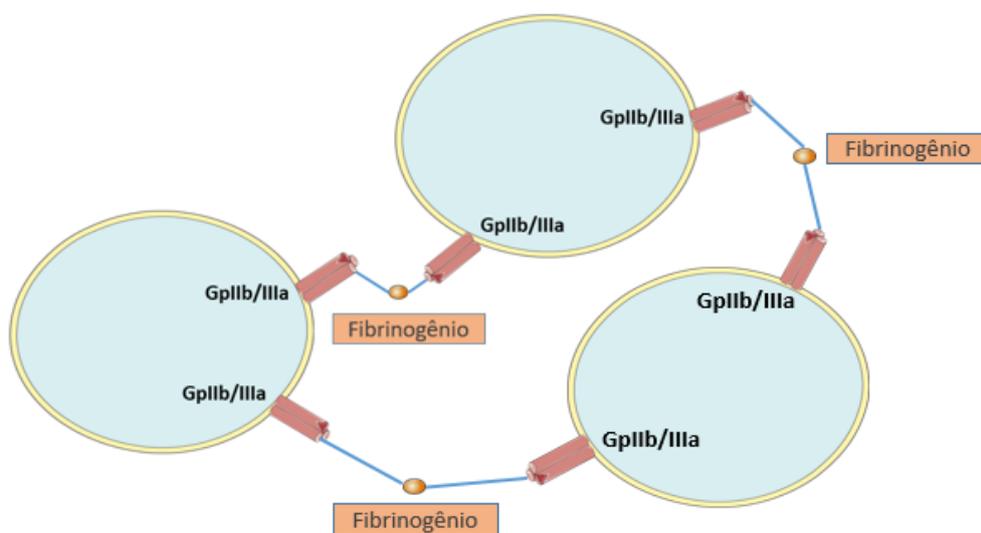
Como mencionado, existem três tipos de grânulos nas plaquetas: os grânulos alfa, os grânulos densos e os lisossomos. Os grânulos alfa são os mais abundantes, estando presentes em seu conteúdo cerca de 300 proteínas, dentre as quais as glicoproteínas do ambiente extracelular GpIIb/IIIa, GpVI e GpIb/IX/V, os fatores de coagulação V e X, os fatores do crescimento, o fibrinogênio, o FvW e também proteínas adesivas como a P-selectina (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017; HOU *et al.*, 2015; RAND; ISRAELS, 2018). A maioria dessas proteínas está presente não apenas nos grânulos, mas também na superfície da plaqueta em repouso, no entanto, a P-selectina só é expressa na membrana plaquetária após ativação e secreção granular, podendo assim, funcionar como um marcador de ativação plaquetária (FERRONI *et al.*, 2009; RAND; ISRAELS, 2018).

No que diz respeito aos grânulos densos, estes se apresentam em menor quantidade nas plaquetas e seu conteúdo inclui os íons cálcio, magnésio e potássio, os nucleotídeos ADP, trifosfato de adenosina (ATP) e trifosfato de guanosina (GTP), as glicoproteínas GpIb e GpIIb/IIIa, além de serotonina e epinefrina. Por fim, os lisossomos são ricos em enzimas hidrolíticas que atuam na degradação e remodelação de trombos (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017; RAND; ISRAELS, 2018).

3.2.4 Agregação

A glicoproteína GpIIb/IIIa na forma ativa interage com o fibrinogênio plasmático para permitir a ligação entre plaquetas. Isto é possível devido ao fato de que o fibrinogênio é uma proteína bivalente que pode se ligar à GpIIb/IIIa de duas plaquetas diferentes, formando uma “ponte” entre elas (Figura 4). Outras proteínas como o FvW, a fibronectina e a vitronectina também podem mediar o processo de agregação. À medida que as plaquetas circulantes vão se agregando no local da lesão, elas tornam-se ativas, o que desencadeia a secreção de grânulos e a amplificação do sinal pró-agregante. O resultado final desse processo é a formação de um tampão plaquetário no local da lesão (AUSTIN, 2017; CLEMETSON, 2012; CIMMINO; GOLINO, 2013).

Figura 4 - Ligação entre plaquetas durante o processo de agregação.



Fonte: A autora.

3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

O processo de hemostasia secundária ou coagulação ocorre por meio de uma reação proteolítica sequencial de pró-enzimas em enzimas. Estas pró-enzimas e enzimas são conhecidas como fatores de coagulação e são denominados por algarismos romanos

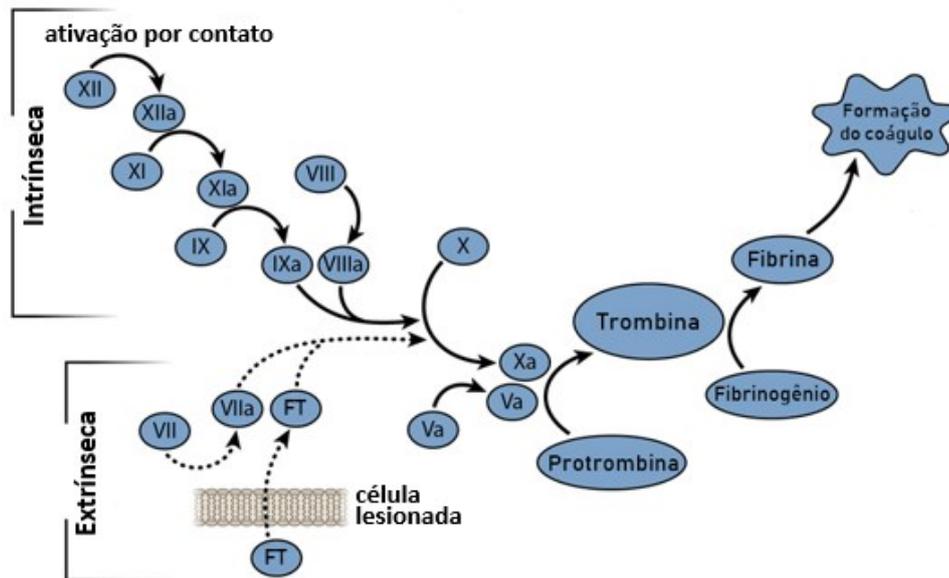
(LORENZI, 2006). Por muito tempo, a hemostasia secundária foi conceituada pelo modelo da cascata clássica da coagulação, o qual dividia o processo em duas vias distintas, a via intrínseca e a via extrínseca, que convergiam em uma única via comum, resultando na geração de trombina. No entanto, este sistema não era capaz de explicar algumas situações observadas *in vivo* como, por exemplo, a razão pela qual os pacientes com deficiência apenas em fatores da via intrínseca tinham tendência a sangramento, uma vez que os fatores da via extrínseca estavam dentro dos valores de referência (FERREIRA *et al.*, 2010). A partir disto, foi proposto um novo modelo baseado em superfícies celulares. Este modelo sugere que o processo de coagulação acontece de maneira sequencial e pode ser dividido em três fases distintas: iniciação, na qual pequenas quantidades de trombina são formadas; de amplificação, em que grandes quantidades de trombina são produzidas; e de propagação, a qual ocorre na superfície plaquetária e grandes quantidades de fibrina são geradas (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Apesar do modelo clássico de coagulação não evidenciar o que ocorre fisiologicamente, este ainda é amplamente empregado, tanto didaticamente, quanto na avaliação laboratorial da hemostasia (AUSTIN, 2017; MONROE; HOFFMAN, 2006). De acordo com o modelo clássico (Figura 5), a via extrínseca da coagulação inicia-se quando ocorre lesão vascular e conseqüentemente exposição do fator tecidual (FT). O FT exposto se liga ao fator VII ativado (FVIIa) circulante, formando o complexo FVIIa/FT, também conhecido como tenase extrínseco. Este complexo age convertendo o fator X (FX) da via comum em sua forma ativada (FXa) (FERREIRA *et al.*, 2010).

A coagulação pela via intrínseca inicia-se quando o fator XII é ativado (FXIIa) ao entrar em contato com superfícies carregadas negativamente, como por exemplo, o colágeno. De forma sucinta, o FXIIa ativa o fator XI (FXIa) que, por sua vez, ativa o fator IX (FIXa). O FIXa liga-se ao fator VIII ativado (FVIIIa) e forma o complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa). Por fim, este complexo converte o FX em sua forma ativada (FERREIRA *et al.*, 2010).

Na via comum, o FX ativado pelas vias extrínseca e intrínseca liga-se ao fator V ativado (FVa), formando o complexo protrombinase. Este complexo é responsável por converter protrombina (FII) em trombina (FIIa) e esta, por sua vez, cliva fibrinogênio (FI) em monômeros de fibrina (FIa). A fibrina formada se deposita por entre o tampão plaquetário, estabilizando-o (FERREIRA *et al.*, 2010).

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



a – ativado; F – fator; FT – fator tecidual. Adaptado de MANOOK *et al.*, 2018.

3.4 FIBRINÓLISE

Após reparação do dano vascular, o coágulo formado precisa ser dissolvido para reestabelecer o fluxo sanguíneo. Diante disto, o sistema fibrinolítico, por meio de suas proteínas, cofatores e receptores, irá promover a dissolução das redes de fibrina (CHAPIN; HAJJAR, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2012).

A principal proteína responsável por este processo é o plasminogênio, uma pró-enzima circulante que será convertida na serina-protease plasmina pela ação de ativadores teciduais como o ativador tecidual do plasminogênio (TPA) e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA). Além disto, outros componentes podem se ligar ao plasminogênio e promover a geração de plasmina, como células endoteliais, monócitos, macrófagos e FXIa. A plasmina gerada cliva fibrina, produzindo produtos solúveis de degradação (CESARMANMAUS; HAJJAR, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2012).

3.5 DISTÚRBIOS DA HEMOSTASIA

Alterações nos processos que envolvem a hemostasia podem desencadear eventos hemorrágicos, caracterizados pelo extravasamento de sangue do espaço vascular para o meio externo, ou tromboembólicos, marcados pela formação de trombos no ambiente vascular arterial ou venoso (BONAR; LIPPI; FAVALORO, 2017; HOFFBRAND; MOSS, 2018).

O tromboembolismo venoso (TEV) e a trombose arterial são distúrbios tromboembólicos responsáveis por uma elevada morbimortalidade no mundo inteiro. O TEV, que inclui a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar, pode ser provocado tanto por condições hereditárias, quanto por condições adquiridas (HOFFBRAND; MOSS, 2018; MAHMOODI *et al.*, 2017). Apenas nos Estados Unidos da América, estima-se que o TEV afete cerca de 300 a 600 mil pessoas por ano e que cause a morte de 60 a 100 mil dessas pessoas (ALVES; ALMEIDA; BALHAU, 2015).

A trombose arterial é a principal causa de DCV, como o AVC, a doença arterial periférica e o infarto do miocárdio (HOFFBRAND; MOSS, 2018; MAHMOODI *et al.*, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCV são a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por 15,2 milhões de mortes no ano de 2016 (WHO, 2018). Além disto, a incidência destas doenças tende a aumentar ainda mais considerando a crescente expectativa de vida da população, uma vez que a prevalência delas é maior em indivíduos idosos (TZORAN; HOFFMAN; MONREAL, 2018). No Brasil, observou-se uma diminuição da mortalidade por DCV nas últimas décadas, no entanto, estas continuam a ser a principal causa de morte no país, sendo responsáveis por cerca de 20% do total de óbito em indivíduos com 30 anos ou mais (MANSUR; FAVARATO, 2016).

Adicionalmente, os distúrbios tromboembólicos estão relacionados com a diminuição da qualidade de vida, invalidez, internações e, conseqüentemente, aumento dos gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), representando assim, um importante problema de saúde pública (GROSSE *et al.*, 2016; KLOK; BARCO; SIEGERINK, 2019; STEVENS *et al.*, 2018).

3.6 TERAPIA ANTITROMBÓTICA

O tratamento dos distúrbios tromboembólicos inclui terapias anticoagulantes, antiplaquetárias e fibrinolíticas. A escolha do medicamento ideal leva em consideração a composição e localização do trombo (ASHOROBÍ; FERNANDEZ, 2019; MEGA; SIMON, 2015). Trombos venosos são formados em uma baixa taxa de cisalhamento e constituídos predominantemente por fibrina. Assim, medicamentos que inibem os fatores de coagulação são pilares no tratamento e prevenção do TEV. Por outro lado, o trombo arterial, formado em altas taxas de cisalhamento, é constituído principalmente por plaquetas e possui uma pequena quantidade de fibrina. Devido ao predomínio de plaquetas, medicamentos antiplaquetários são os de escolha para o tratamento e prevenção da trombose arterial, que pode envolver o uso de apenas um agente antiagregante (monoterapia) ou a combinação de mais de um agente (terapia antiplaquetária dupla). Por fim, os agentes fibrinolíticos são utilizados na dissolução de coágulos, venosos ou arteriais, restaurando o fluxo sanguíneo (ASHOROBÍ; FERNANDEZ, 2019; WEITZ; EIKELBOOM; SAMAMA, 2012).

Dentre os antiplaquetários, o mais comumente prescrito para o tratamento e prevenção de DCV é o AAS. Além deste, outros agentes como: clopidogrel, prasugrel, ticagrelor e ticlopidina são amplamente utilizados. O AAS é um inibidor irreversível da ciclooxigenase 1 (COX-1), enzima responsável pela produção de TXA₂, um importante agregante plaquetário. Por desencadear uma inibição irreversível, a ação do AAS vai permanecer durante toda a vida útil da plaqueta, que gira em torno de 7 a 10 dias (KEI *et al.*, 2011; MEGA; SIMON, 2015). Apesar do AAS ser efetivo na prevenção secundária de DCV aterotrombóticas, ele também aumenta o risco de hemorragias gastrointestinal e intracraniana, e pode promover a formação de úlcera gástrica, o que limita o seu uso (RICHMAN; OWENS, 2017; WEITZ; EIKELBOOM; SAMAMA, 2012).

Os antiagregantes ticlopidina, clopidogrel e prasugrel constituem a classe de medicamentos tienopiridínicos, os quais inibem a agregação plaquetária através da inativação irreversível do receptor P2Y₁₂. A ticlopidina é a primeira geração dos tienopiridínicos e é capaz de reduzir a incidência de infarto do miocárdio e AVC. Por ser um pró-fármaco, ou seja, precisa ser metabolizado em sua forma ativa para exercer sua atividade, sua inibição plaquetária máxima ocorre apenas 8 a 10 dias após a sua administração. Além disso, por

produzir uma inibição plaquetária irreversível, a restauração da função plaquetária só ocorre dias após a interrupção do tratamento, o que dificulta ou até inviabiliza a realização de alguns procedimentos cirúrgicos de emergência. Atualmente, a ticlopidina vem sendo cada vez menos utilizada na prática clínica por apresentar relevantes efeitos adversos, como reações alérgicas, diarreia, neutropenia e trombocitopenia. Devido a isto, ela tem sido substituída pelo seu análogo, o clopidogrel (KEI *et al.*, 2011; MEGA, 2015; SBC, 2013).

Assim como a ticlopidina, o clopidogrel é um pró-fármaco e seu metabolismo ocorre no fígado, por meio do citocromo P450, principalmente pela isoenzima CYP2C19 (PEREIRA *et al.*, 2019). Apenas 15% do fármaco é transformado em seu metabólito tiol ativo e os 85% restantes são hidrolisados por esterases (KEI *et al.*, 2011). O clopidogrel é utilizado na prevenção de eventos trombóticos em pacientes com doença vascular periférica, infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico isquêmico (SBC, 2013). Apesar de eficaz, ele possui limitações de uso, que incluem interações medicamentosas, interações com alimentos e uma grande variabilidade interpessoal de resposta. A variabilidade de resposta do fármaco está relacionada principalmente a polimorfismos genéticos da isoenzima CYP2C19. Variações desta isoenzima resultam em perda da sua atividade e, conseqüente, diminuição da metabolização de clopidogrel em seu metabólito ativo, reduzindo assim a sua ação antiagregante e aumentando o risco de eventos cardiovasculares (PEREIRA *et al.*, 2019; WEITZ; EIKELBOOM; SAMAMA, 2012). Além disto, outros medicamentos, como os inibidores de bombas de prótons (omeprazol e esomeprazol) afetam a ação antiagregante do clopidogrel, pois inibem a CYP2C19 (MEGA; SIMON, 2015).

O prasugrel é uma tienopiridina de terceira geração que possui atividade antiagregante superior, mais rápida e com menor variabilidade interpessoal de resposta quando comparada ao clopidogrel (ANGIOLILLO; BATES; BASS, 2008). Estudos demonstraram que o efeito superior de prasugrel está relacionado ao seu metabolismo (BRANDT *et al.*, 2007; SUGIDACHI *et al.*, 2007), uma vez que, após sua administração, ele sofre ação de esterases hepáticas e intestinais que formam metabólitos ativos que são mais absorvidos (MEGA; SIMON, 2015). Estas características tornam o prasugrel mais efetivo do que o antiplaquetário clopidogrel, no entanto, sua potente atividade antiagregante está relacionada a um risco aumentado de sangramento (ANGIOLILLO; BATES; BASS, 2008).

O ticagrelor não é um pró-fármaco e, devido a isto, apresenta um início de ação mais rápido do que os tienopiridínicos. Outra vantagem deste fármaco em relação aos tienopiridínicos é que ele produz uma inibição reversível do receptor P2Y₁₂ e, portanto, a

reversão do seu efeito antiagregante é mais rápida, o que se torna favorável em situações de sangramentos ou em casos em que é necessária cirurgia de urgência. Apesar de ele possuir alta eficácia na prevenção e tratamento de eventos cardiovasculares, o seu uso está relacionado com um risco aumentado de sangramento. Além disto, há relatos de o ticagrelor causar dispneia, bradicardia e elevação das concentrações de ácido úrico, o que limita sua utilização (AL-SALAMA; KEATIN; KEAM, 2017).

Os anticoagulantes, por sua vez, são mais utilizados no tratamento e prevenção de distúrbios embólicos venosos, podendo ser administrados por via oral ou parenteral (HOFFBRAND; MOSS, 2018). A heparina é um fármaco de uso parenteral amplamente utilizado que atua potencializando a ação da antitrombina, um anticoagulante natural que forma complexos e inativa os fatores IIa, IXa, Xa e XIa (MULLOY *et al.*, 2016). Dentre os anticoagulantes orais atualmente disponíveis, a varfarina é a mais comumente prescrita na prática clínica e, assim como a heparina, ela atua sobre múltiplos fatores de coagulação, especificamente os dependentes de vitamina K (II, VII, IX e X) (MEGA; SIMON, 2015). Na última década, novos anticoagulantes orais, conhecidos como anticoagulantes orais diretos (DOACs), foram desenvolvidos e aprovados para uso, sendo que os mais utilizados atualmente são a dabigatrana, a rivaroxabana e a apixabana. Os DOACs atuam inibindo fatores específicos de coagulação. A dabigatrana inibe a trombina, enquanto a rivaroxabana e a apixabana inibem o FXa (SALEM; SABOURET; FUNCK-BRENTANO, 2015). Todos os anticoagulantes mencionados mostram-se eficazes na prevenção e tratamento de distúrbios tromboticos, tais como embolia pulmonar e trombose venosa profunda. No entanto, seu uso, de forma geral, está relacionado com uma elevada incidência de sangramento grave, trombocitopenia, além de apresentar diversas interações medicamentosas e alimentares (ELDREDGE; SPYROPOULOS, 2018; MEGA; SIMON, 2015; SPRÜGE *et al.*, 2019).

Como pode ser observado, os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento de distúrbios tromboembólicos apresentam elevado risco de complicações (ELDREDGE; SPYROPOULOS, 2018; RICHMAN; OWENS, 2017; WEITZ; EIKELBOOM; SAMAMA, 2012). Diante disto, e devido ao fato desses distúrbios significarem um grande problema de saúde pública mundial, torna-se imprescindível a identificação de novas moléculas que possam ser usadas como protótipos no desenvolvimento

de fármacos mais seguros, e que apresentem menores limitações (GROSSE *et al.*, 2016; MEGA; SIMON, 2015; STEVENS *et al.*, 2018).

3.7 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais (PN), oriundos de fontes vegetais, bacterianas, fúngicas e marinhas, são importantes alvos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos por apresentarem maiores benefícios quando comparados aos compostos não naturais. Dentre as vantagens dos PN, pode-se citar a alta diversidade, complexidade química e eficácia de ligação e interação com alvos biológicos. Nas últimas décadas, os PN e seus derivados apresentaram diversas atividades biológicas, dentre as quais antitumoral, antibacteriana, antiparasitária e antiviral. Estima-se que, atualmente, mais de 50% dos medicamentos disponíveis no mercado sejam de origem natural ou baseados em moléculas de origem natural (KATZ; BALTZ, 2016; MARTINS *et al.*, 2014).

Diversas são as fontes naturais para a pesquisa de novas moléculas, no entanto, o ambiente marinho, por corresponder a 70% da superfície terrestre e abranger uma grande diversidade de organismos ainda inexplorados, tornou-se um dos ambientes mais visados e estudados (MALVE, 2016; MARTINS *et al.*, 2014). Dentre os organismos marinhos, as algas são responsáveis pela produção de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos, como proteínas, minerais, polissacarídeos, ácidos graxos e antioxidantes (DAHMS; DOBRETSOV, 2017; MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012), que apresentaram atividade biológica como antiviral, anticâncer, anti-inflamatória e imunossupressora (DAHMS; DOBRETSOV, 2017; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2017). No que tange a hemostasia, estudos evidenciaram que uma variedade de compostos isolados de algas marinhas possui atividade antitrombótica (MOURA *et al.*, 2014; SYRACUSE, 2018).

As algas podem ser classificadas, em função de suas organelas e de acordo com seus pigmentos, em três grandes grupos: algas verdes (Chlorophyceae), algas pardas (Phaeophyceae) e algas vermelhas (Rhodophyceae), sendo esta última classe de menor interesse biológico devido à baixa atividade de seus metabólitos. As algas vermelhas produzem principalmente metabólitos halogenados, monoterpenos, sesquiterpenos e acetogeninas; as algas verdes produzem sesquiterpenos e diterpenos e; as algas pardas

produzem principalmente diterpenos e são conhecidas por suas quinonas (BLUNT *et al.*, 2003; FAULKNER, 2001).

A classe das algas pardas possui cerca de 1.500 espécies, como as da ordem Desmarestiales que inclui as espécies *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia anceps* e *Desmarestia menziesii*. A alga *D. menziesii* é endêmica na antártica, podendo ser encontrada na superfície e em até 30 metros de profundidade (KLOSER; QUARTINO; WIENCKE, 1996; NORTON; MELKONIAN; ANDERSEN, 1996). Um estudo envolvendo o isolamento e avaliação da atividade de compostos isolados da alga *D. menziesii* demonstrou que o composto menzoquinona isolado dessa alga possui atividade antimicrobiana e anti-herbivoria (ANKISETTY *et al.*, 2004). Não foi encontrada na literatura pesquisada estudos que avaliaram a atividade de compostos isolados da alga *D. menziesii* sobre a hemostasia, contudo, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que extratos brutos da alga *D. menziesii* foram capazes de inibir significativamente a agregação plaquetária (MEYER, 2019).

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

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

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

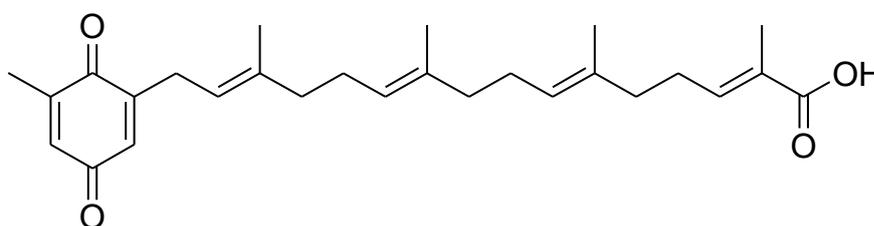
As amostras foram coletadas no Banco de Sangue do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH). Os doadores considerados aptos pela triagem clínica do banco de sangue foram convidados a participar do presente estudo. Após uma sucinta explicação sobre a pesquisa, seus riscos e benefícios, os doadores concordantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, foram coletados até dois tubos de sangue total de cada doador por meio de punção venosa. Todos os ensaios foram realizados com amostras de pelo menos três doadores diferentes.

4.3 MENZOQUINONA

A menzoquinona foi obtida e gentilmente cedida pela doutoranda Ana Cláudia Philippus sob orientação da Professora Doutora Miriam de Barcellos Falkenberg do Laboratório de Investigação de Produtos Naturais Marinhos da UFSC. Resumidamente, amostras da alga parda *D. menziesii* foram coletadas em Punta Plaza, no continente Antártico, no mês de dezembro de 2015. Após o recebimento da alga, a mesma foi seca sob ar frio e macerada em diclorometano e metanol em uma proporção 2:1. Posteriormente, foi realizada a purificação do extrato bruto através de processos cromatográficos, obtendo-se a menzoquinona (**1**).

A estrutura da menzoquinona (Figura 6) foi elucidada por ressonância magnética nuclear (RMN) e seus dados foram comparados com a literatura (ANKISETTY *et al.*, 2004).

Figura 6 - Estrutura da menzoquinona isolada da alga parda *Desmarestia menziesii*.



Fonte: A autora.

Por fim, o Composto 1 foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração estoque de 100 mM e armazenado a 4 °C. Para realização dos ensaios, a solução estoque foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 no mesmo dia do experimento, de maneira a se obter concentrações finais entre 500 e 15,63 μ M.

4.4 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Para avaliar o efeito do Composto 1 sobre as vias intrínseca e extrínseca da coagulação, foram realizados os testes de TTPa e de TP, respectivamente. Para isto, as amostras de pelo menos três doadores foram coletadas em tubo contendo citrato de sódio 3,2% como anticoagulante e centrifugadas a 1.107 g, durante 15 minutos a 4 °C para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP dos diferentes doadores foi misturado para se obter o *pool* de PPP.

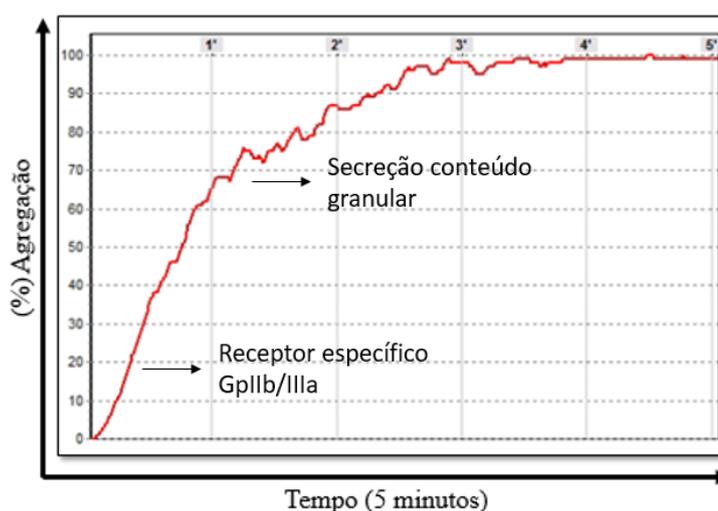
Os testes TP e TTPa foram realizados de acordo com a bula dos conjuntos diagnóstico CLOT TP e CLOT TTPa (BIOSs Diagnóstica, São Paulo, BR), respectivamente, e seus tempos de coagulação foram analisados em coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer). Resumidamente, para a realização do TTPa, 100 μ L do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 μ L de Composto 1 (500 μ M, concentração final) ou de DMSO (0,5%, controle negativo) e 100 μ L de cefalina ativada. Após incubação, 100 μ L de cloreto de cálcio foram adicionados e simultaneamente o cronômetro foi acionado para a contagem do tempo de coagulação. Para o TP, 100 μ L do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C com 10 μ L de Composto 1 (500 μ M, concentração final) ou

de DMSO 0,5% (controle negativo) durante cinco minutos. Posteriormente, 200 μ L de tromboplastina cálcica foram adicionadas e o tempo de coagulação foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.5 ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação foram analisados por turbidimetria por meio do método descrito por Born e Cross (1963), com algumas modificações, utilizando-se um agregômetro de plaquetas semi-automatizado (Agrego, Qualitem). Este ensaio permite avaliar as diferentes fases da cinética de agregação durante a formação do agregado. Após a adição do agonista, forma-se uma onda primária de agregação que representa a interação do agonista com seu respectivo receptor e a presença da GpIIb/IIIa. Já a segunda onda corresponde à agregação secundária, decorrente da secreção endógena dos componentes presentes nos grânulos plaquetários (Figura 7) (BRASIL, 2016).

Figura 7 - Representação da curva de agregação plaquetária.



Fonte: A autora.

Para realização dos experimentos, amostras de pelo menos três doadores foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio 3,2% e, em seguida, centrifugadas a 123 g por 10 minutos à temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O

PRP dos diferentes doadores foi misturado para se obter o *pool* de PRP. Posteriormente, as plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas com PBS pH 7,4 para 250.000 plaquetas/mm³. Para realização dos ensaios, 400 µL de PRP foram incubados com 10 µL de Composto **1** (500 µM, concentração final), de ticlopidina (10 mM, controle positivo) ou de DMSO (0,5%, controle negativo) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após, a agregação foi estimulada pela adição de ADP (10 µM, concentração final), epinefrina (5 µg/mL, concentração final) ou colágeno (2 µg/mL, concentração final), e a taxa de agregação foi monitorada durante cinco minutos. 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 ensaios de agregação foram realizados em triplicata e em até três horas após a coleta das amostras.

4.5.1 Avaliação da atividade frente ao tempo de incubação

Ensaio adicionais de agregação foram realizados para avaliar se o efeito do Composto (**1**) é tempo-dependente. Para isto, o mesmo foi incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente com 400 µL de *pool* de PRP e a agregação foi posteriormente estimulada pelos agonistas ADP, epinefrina e colágeno.

4.5.2 Determinação da concentração inibitória de 50% (CI₅₀)

Para os agonistas plaquetários cuja agregação na presença do Composto **1** foi inferior a 50%, foi realizada a curva de concentração-resposta. Para determinar a CI₅₀ do Composto **1**, o mesmo foi avaliado nas seguintes concentrações: 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,63 µM. Após realizar as diluições do composto isolado utilizando PBS pH 7,4 como diluente, o mesmo foi incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente com um *pool* de PRP e a agregação plaquetária foi mensurada como descrito no item 4.5. Por fim, a CI₅₀ foi obtida a partir da curva concentração-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

4.6 TESTE DE VIABILIDADE PLAQUETÁRIA

A avaliação do efeito do Composto **1** sobre a viabilidade plaquetária foi realizada por meio do teste de exclusão com Azul de Tripán 0,04% conforme descrito por Lopez *et al.* (2015). O método de exclusão baseia-se no fato de que membranas celulares intactas não permitem a entrada do corante, enquanto membranas danificadas impregnam-se com o corante e coram-se de azul (STROBER, 2001).

Para a realização dos ensaios, 400 µL de PRP foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente com 10 µL de Composto **1** (500 µM, concentração final), de DMSO 0,5% (controle negativo) ou do reagente *Fix and Perm* (Nordic MUBio, Susteren, NL) (controle positivo). Após, uma alíquota do PRP tratado foi transferido para um tubo contendo igual volume do Azul de Tripán (0,04%, concentração final) e a viabilidade das plaquetas foi analisada em câmara de Neubauer. As leituras foram realizadas por três examinadores diferentes e as plaquetas impregnadas pelo corante foram consideradas como não viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de plaquetas não viáveis, conforme demonstrado na Equação 1. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de plaquetas impregnadas com corante (não viáveis).

$$\% \text{ Plaquetas não viáveis} = \frac{P_i \times 100}{P_t}$$

P_i – total de plaquetas impregnadas com o corante azul de Tripán; P_t – número total de plaquetas contadas na amostra. Fonte: A autora.

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

A ativação plaquetária foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando os anticorpos monoclonais anti-PAC1-FITC (clone PAC-1; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e anti-CD62P-PE (clone AK-4; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) para caracterizar a expressão da glicoproteína de membrana GpIIb/IIIa ativada e da proteína adesiva P-selectina, respectivamente. Como já mencionado, a GpIIb/IIIa está presente na superfície da membrana plaquetária e, após estimulação da plaqueta por algum agonista, sua conformação é alterada para sua forma ativada. Já a P-selectina está presente nos grânulos alfa das plaquetas, sendo

liberada e expressa na membrana da plaqueta após ativação e consequente secreção endógena dos grânulos plaquetários (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017; LANDI; JÚNIOR, 2003). Para identificar tanto as plaquetas ativadas como as inativas, foi utilizado o anticorpo anti-CD61-PerCP (clone PN IM 1758U; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), que se liga a ambas as formas de GpIIb/IIIa.

Para a realização dos experimentos, diferentes concentrações do composto (54,8 μM e 500 μM) foram incubadas com 400 μL de PRP durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi estimulada com 10 μL de agonista plaquetário e novamente incubada durante 5 minutos. Em um tubo de ensaio, 50 μL do PRP estimulado foi marcado com os anticorpos anti-CD61-PerCP (2 μL), anti-PAC1-FITC (20 μL) e anti-CD62P-PE (5 μL), e incubados durante 15 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a solução foi lavada com 2 mL de PBS pH 7,4 e centrifugada por 5 minutos a 277 g. Por fim, o sobrenadante foi descartado, o depósito foi suspenso com 500 μL de PBS pH 7,4 e imediatamente analisado no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) utilizando-se o software FACSDiva versão 6.1.2 (Becton Dickinson, EUA). Da mesma forma, um tubo contendo PRP tratado com DMSO 0,5% foi marcado com os anticorpos, sem a estimulação de agonistas, para descartar uma autoativação das plaquetas. Em cada tubo foram analisados 10.000 eventos positivos para CD61 na forma de histogramas e intensidade de fluorescência média (IFM).

Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados no software Infinicyt (Cytognos®) versão 1.7. As plaquetas foram identificadas por meio de suas características de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente), bem como pela sua positividade para CD61. A IFM dos marcadores foi analisada pela ferramenta de fusão de arquivos (do inglês, *file merge*) do software de análise Infinicyt. Resumidamente, foi realizada a fusão dos arquivos de cada dia de experimento em um único arquivo. O produto final consiste em um arquivo contendo as informações de um grupo de experimentos que permite a visualização simultânea das plaquetas em relação a todos os marcadores fenotípicos presentes no painel de anticorpos. Por fim, os resultados dos ensaios foram expressos como porcentagem de inibição, a partir da intensidade de fluorescência média (IFM), segundo a Equação 2 (BIRIS *et al.*, 2003). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

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

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

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

4.8 TESTE DE HEMÓLISE

Neste ensaio, foi avaliado se a menzoquinona era capaz de causar ruptura da membrana de eritrócitos de indivíduos saudáveis, provocando assim, sua hemólise. Para isto, as amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 264 g e o sedimento foi sucessivamente lavado com solução salina (NaCl 0,9%) para que os eritrócitos fossem isolados do restante do plasma. Para a realização dos testes, misturou-se em tubos tipo eppendorf 50 µL de suspensão estoque de eritrócitos e 950 µL de solução salina, e essas suspensões foram tratadas com a menzoquinona em concentrações que variaram de 54,8 µM a 280,0 µM. Como controle positivo (100 % de hemólise), utilizou-se água destilada e, como controle negativo (0 % de hemólise), usou-se solução salina.

Cada tubo teste foi incubado por uma hora sob agitação constante de 100 g a 37 °C (WANG *et al.*, 2009). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro Microwell Systems a 540 nm. Por fim, a taxa de hemólise foi calculada de acordo com a densidade óptica de cada amostra e controles, relacionada à quantidade de hemoglobina livre no sobrenadante (Equação 3).

Equação 3 - Cálculo da taxa de hemólise.

$$\text{Taxa de Hemólise (\%)} = \frac{\text{DOt} - \text{DOcn} \times 100}{\text{DOcp} - \text{DOcn}}$$

DOcn – densidade óptica do controle negativo; DOcp – densidade óptica do controle positivo; DOt – densidade óptica da amostra teste. Fonte: A autora.

4.9 PREDIÇÃO TEÓRICA DA BIODISPONIBILIDADE ORAL, DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL DO COMPOSTO

Os ensaios de predição teórica da toxicidade e do potencial da menzoquinona vir a se tornar um novo fármaco foram realizados *in silico* por meio da utilização do programa *Osiris*[®] *Property Explorer* (<http://www.organicchemistry.org/prog/peo/>). Neste programa, foi realizado o desenho da estrutura química do composto menzoquinona e avaliados os seguintes parâmetros de toxicidade: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução. Além disto, também foram avaliados dois valores preditivos do potencial do composto: *Druglikeness* e *Drug score*.

A predição teórica da biodisponibilidade oral da menzoquinona foi realizada por meio de modelos computacionais e analisada pelos parâmetros físicoquímicos proposto por Lipinski e cols. (2001). A partir do programa *Free molinspiration* disponibilizado *online* no *site*: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, avaliaram-se os seguintes parâmetros: *miLogP*, massa molecular (MM), número de aceptores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de átomos N e O), número de doadores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de OH e NH na molécula) e número de violações.

Além do composto, também foram analisadas as estruturas de dois fármacos antiplaquetários amplamente utilizados na prática clínica, o AAS e o clopidogrel.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

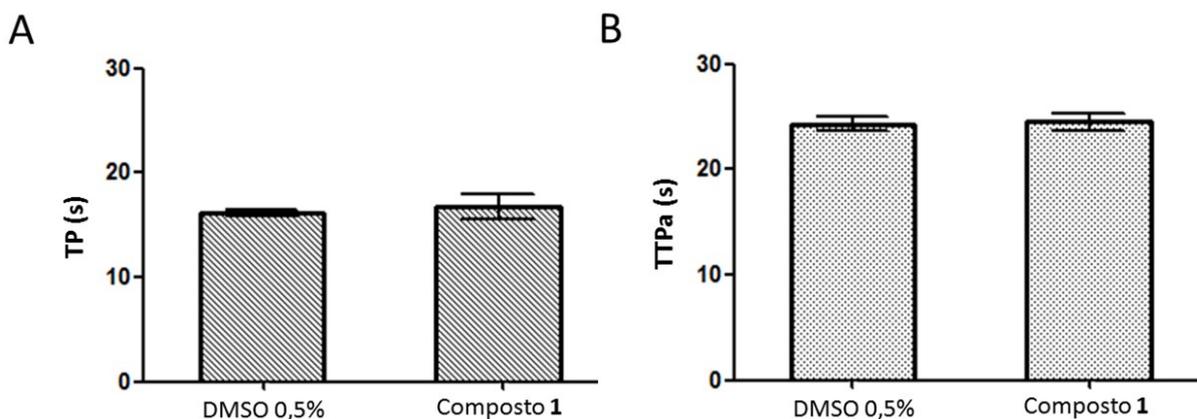
A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *MedCalc*[®] v.18.9 e para a confecção das figuras foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0*[®]. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. As médias das variáveis foram comparadas utilizando-se o teste t de Student para amostras independentes. Foi adotado um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE A COAGULAÇÃO

Inicialmente, avaliou-se o efeito da menzoquinona sobre a coagulação sanguínea humana. Como pode ser observado na Figura 8, o Composto 1 não foi capaz de prolongar significativamente os tempos de TP ($16,7 \pm 1,2$ s) e TTPa ($24,5 \pm 0,8$ s) quando comparado com o controle ($16,1 \pm 0,3$ s e $24,3 \pm 0,7$ s, respectivamente). Isto indica que o composto estudado não possui efeito sobre a coagulação sanguínea humana. Adicionalmente, quando o Composto 1 foi misturado com o PPP, esse não foi capaz de ativar por si só a coagulação.

Figura 8 - Efeito do Composto 1 (500 μ M) sobre os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada.



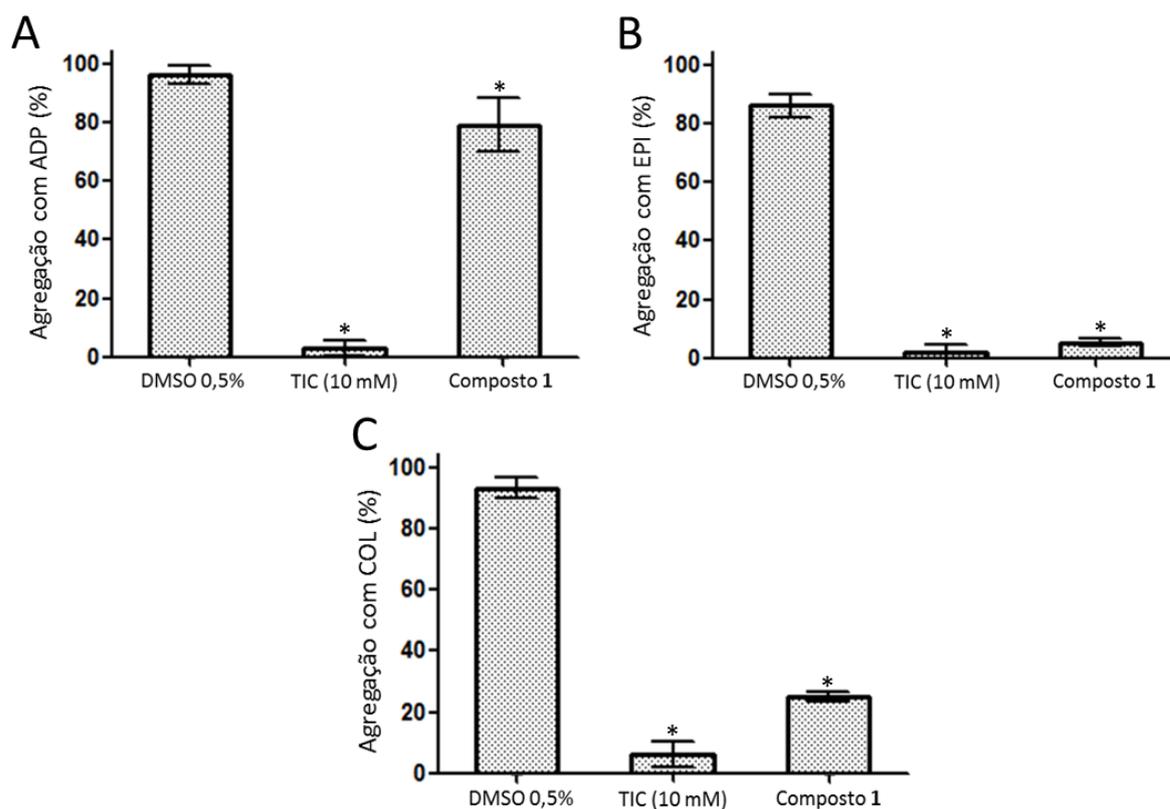
Painel A – Tempo de protrombina (TP); Painel B – Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa); Composto 1 – menzoquinona; DMSO – dimetilsulfóxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos individuais. Fonte: A autora.

5.2 EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

O efeito do Composto 1 sobre a agregação foi avaliado frente ao perfil de agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina e colágeno. Como pode ser visto na Figura 9, o Composto 1 foi capaz de inibir significativamente a agregação induzida por todos os agonistas testados quando comparado ao controle (DMSO 0,5%). Nos ensaios em que o ADP foi utilizado como agonista, a agregação plaquetária na presença do Composto 1 foi de $79,3 \pm 9,0\%$ (controle $96,5 \pm 3,8\%$). A inibição da agregação plaquetária foi mais intensa quando

utilizado colágeno e epinefrina como agonistas, resultando em uma agregação plaquetária de apenas $25,0 \pm 1,4\%$ (controle $86,3 \pm 4,0\%$) e $5,3 \pm 1,5\%$ (controle $93,5 \pm 3,5\%$), respectivamente.

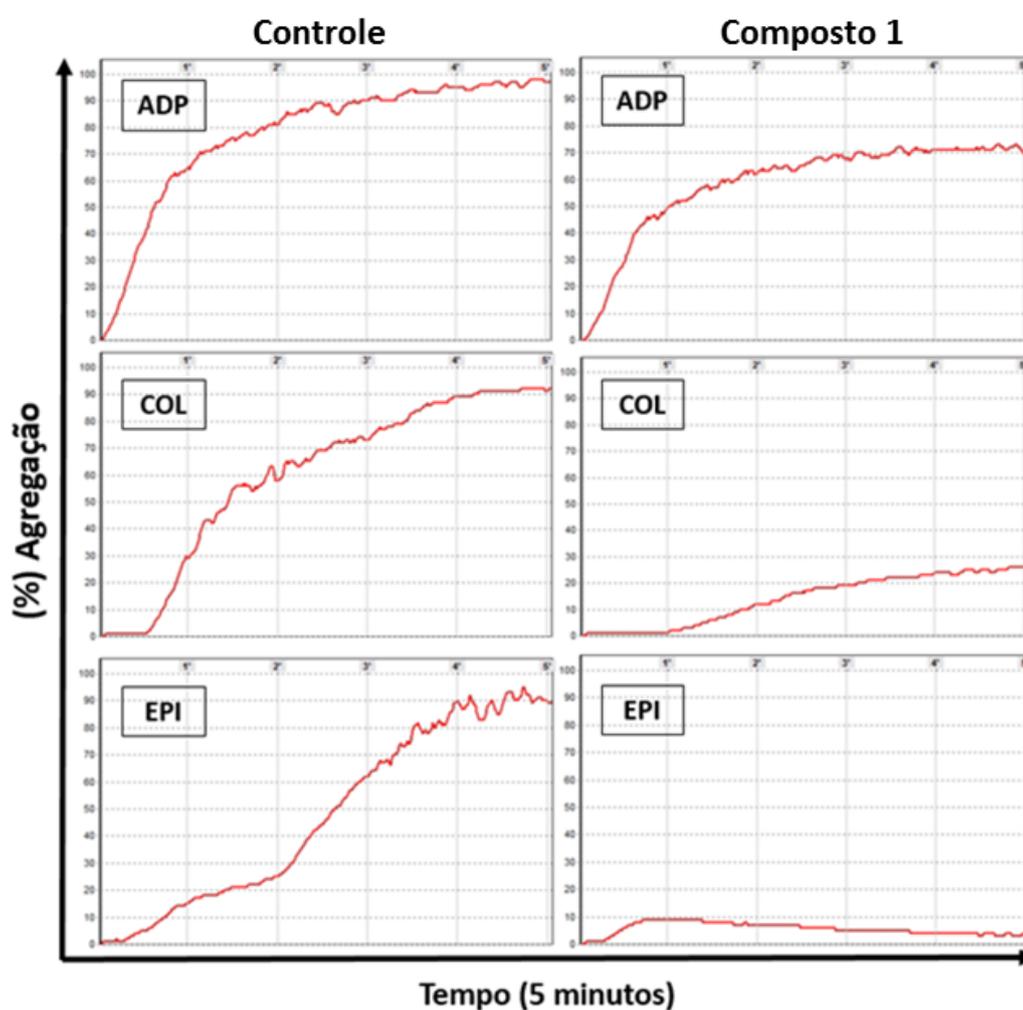
Figura 9 - Efeito do Composto 1 (500 μM) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (10 μM), epinefrina (5 $\mu\text{g/mL}$) e colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$).



Painel A – Agregação plaquetária induzida por ADP; Painel B – Agregação plaquetária induzida por epinefrina; Painel C – Agregação plaquetária induzida por colágeno; Composto 1 – menzoquinona; TIC – ticlopidina; ADP – difosfato de adenosina; COL – colágeno; EPI – epinefrina; DMSO – dimetilsulfóxido. * Valor de $p \leq 0,05$ quando comparado ao DMSO 0,5%. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos individuais. Fonte: A autora.

Quando comparados os perfis das curvas de agregação dos controles com DMSO 0,5% e do Composto 1, pode-se verificar que o composto inibiu parcialmente a segunda onda de agregação induzida pelo ADP e colágeno, e reverteu a primeira onda de agregação induzida pela epinefrina (Figura 10).

Figura 10 – Imagem ilustrativa do efeito do Composto 1 (500 μ M) sobre o perfil de agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP – 10 μ M), epinefrina (EPI - 5 μ g/mL) e colágeno (COL - 2 μ g/mL).



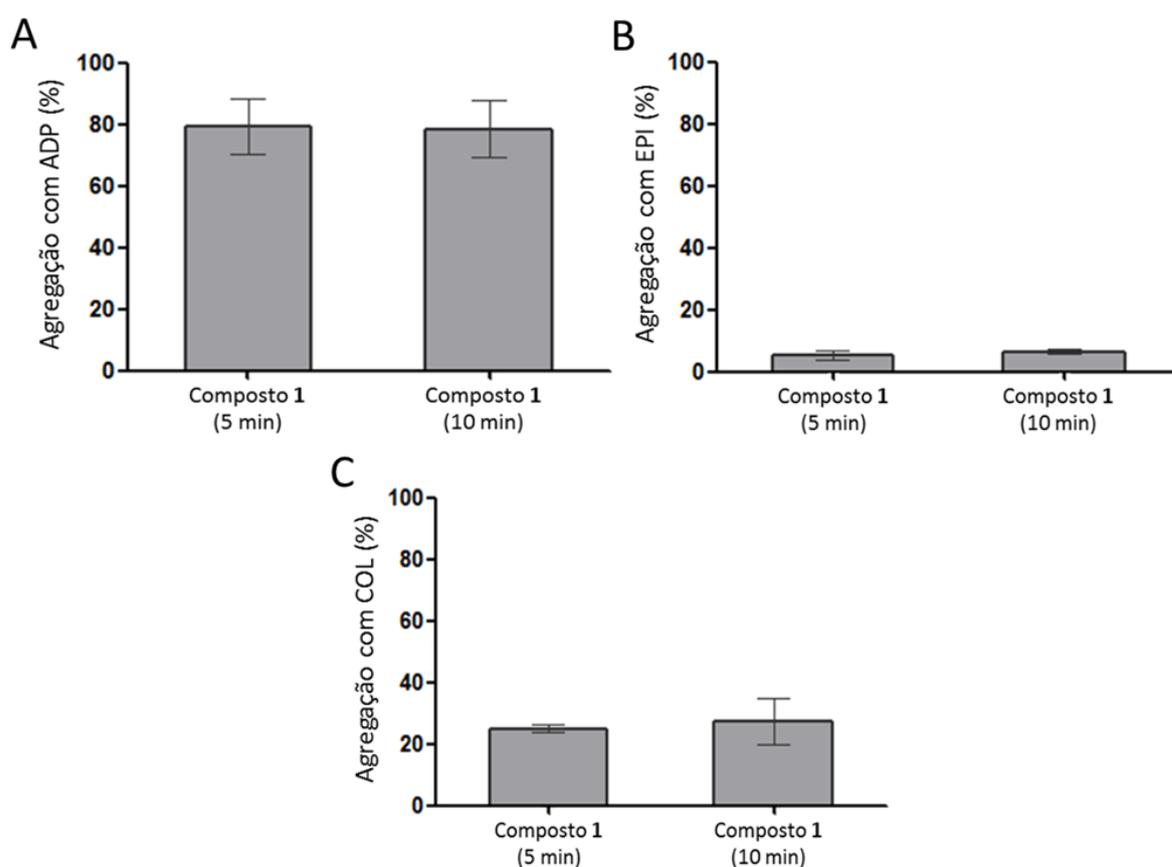
Controle – plaquetas tratadas com dimetilsulfóxido 0,5%. Fonte: A autora.

5.2.1 Avaliação da atividade do Composto 1 frente ao tempo de incubação

Para avaliar se o efeito antiagregante do Composto 1 dependia do tempo de incubação, o mesmo foi incubado com o PRP durante um período de 10 minutos e, após, o

PRP tratado foi estimulado com ADP, epinefrina ou colágeno. A agregação média obtida após 10 minutos de incubação com ADP ($78,5 \pm 9,2\%$), epinefrina ($6,5 \pm 0,7\%$) e colágeno ($27,5 \pm 7,5\%$) não foi significativamente ($P = 0,899$, $P = 0,278$ e $P = 0,601$, respectivamente) diferente da encontrada com cinco minutos (ADP - $79,5 \pm 9,0\%$; epinefrina - $5,3 \pm 1,5\%$; colágeno - $25,0 \pm 1,4\%$), mostrando que o efeito antiagregante do Composto 1 não é dependente de tempo (Figura 11).

Figura 11 - Efeito antiagregante do Composto 1 ($500 \mu\text{M}$) em relação a diferentes períodos de incubação (5 e 10 minutos).

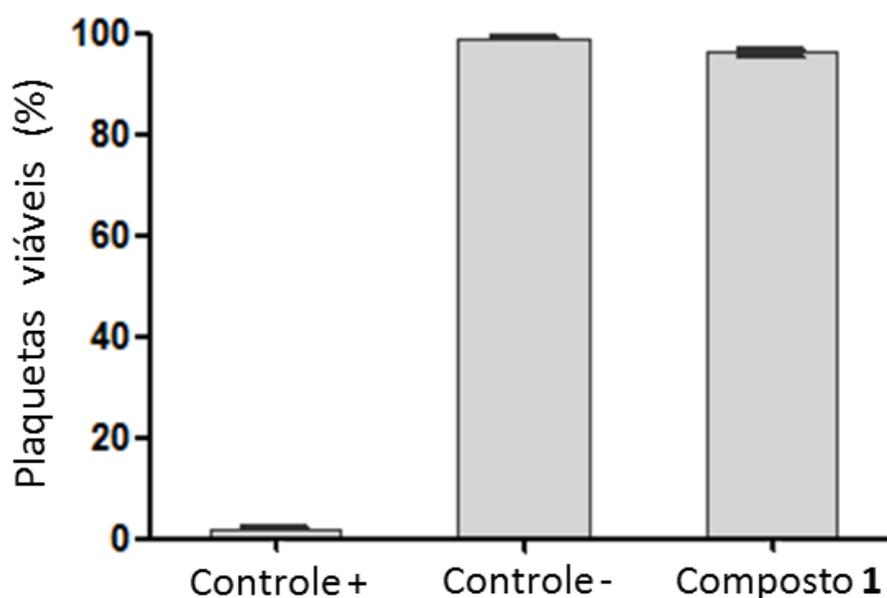


Painel A – Agregação plaquetária induzida por ADP ($10 \mu\text{M}$); Painel B – Agregação plaquetária induzida por epinefrina ($5 \mu\text{g/mL}$); Painel C – Agregação plaquetária induzida por colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$). Composto 1 – menzoquinona; ADP – difosfato de adenosina; COL – colágeno; EPI – epinefrina; min - minutos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos individuais. Fonte: A autora.

5.3 EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE A VIABILIDADE PLAQUETÁRIA

Uma vez que o Composto 1 inibiu significativamente a agregação plaquetária, realizou-se o ensaio de viabilidade plaquetária para identificar se seu efeito é de fato inibitório ou se o composto estaria exercendo efeito tóxico sobre as plaquetas. Na Figura 12 estão os resultados dos experimentos. Como se pode observar, o Composto 1 não reduziu a viabilidade plaquetária ($96,2 \pm 0,9\%$ de plaquetas viáveis) em relação ao ensaio controle realizado na presença de DMSO 0,5% ($99,1 \pm 0,4\%$ de plaquetas viáveis).

Figura 12 - Efeito do Composto 1 ($500 \mu\text{M}$) sobre a viabilidade plaquetária.

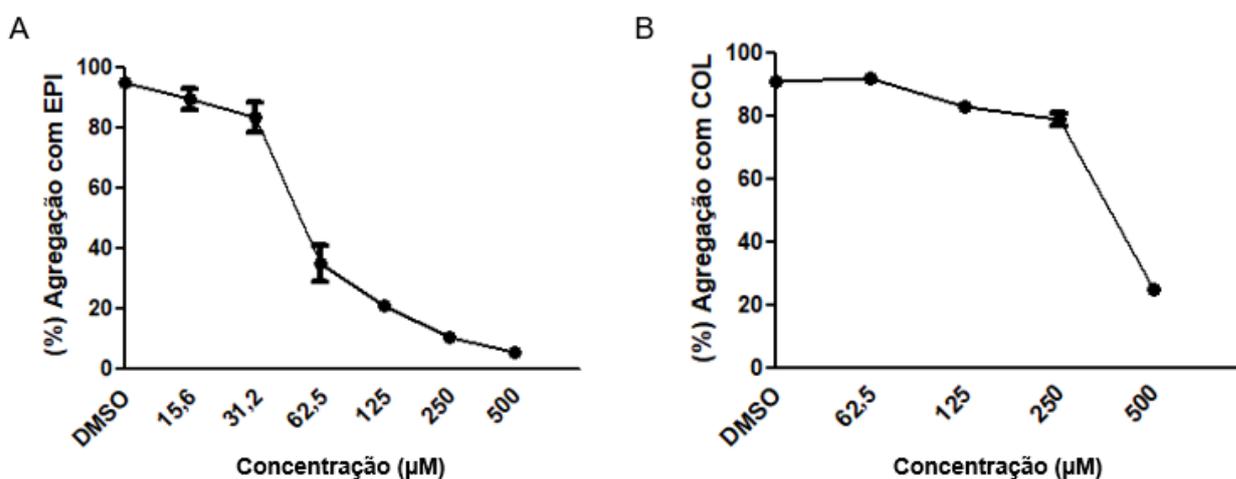


Controle positivo - *kit* de permeabilização *Fix and Perm*; Controle negativo - dimetilsulfóxido 0,5%; Composto 1 – menzoquinona ($500 \mu\text{M}$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos individuais. Fonte: A autora.

5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50%

Sabendo que o Composto 1 não interfere na viabilidade das plaquetas, deu-se seguimento aos estudos. Neste momento, foram realizadas diluições seriadas do composto para avaliar se seu efeito antiagregante é dependente da concentração. Como pode ser visto na Figura 13, o efeito antiagregante diminui de forma dependente da concentração do Composto 1.

Figura 13 – Curva de concentração-reposta do Composto 1 em relação a agregação induzida por epinefrina (5 µg/mL) e colágeno (2 µg/mL).



Painel A – Curva de concentração-reposta da agregação induzida por epinefrina (EPI); Painel B – Curva de concentração-reposta da agregação desencadeada por colágeno (COL). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos individuais. Fonte: A autora.

Com base nas curvas obtidas, foi possível determinar a CI_{50} para cada agonista (Tabela 1). A melhor CI_{50} do Composto 1 foi de $54,8 \pm 2,1$ µM frente à epinefrina.

Tabela 1 – Concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do Composto 1.

Tratamento	CI_{50} (µM)	
	Epinefrina (5 µg/mL)	Colágeno (2 µg/mL)
Composto 1	$54,8 \pm 2,1$	$426,9 \pm 18,4$

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão de três experimentos individuais. Fonte: A autora.

5.5 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa E DE P-SELECTINA

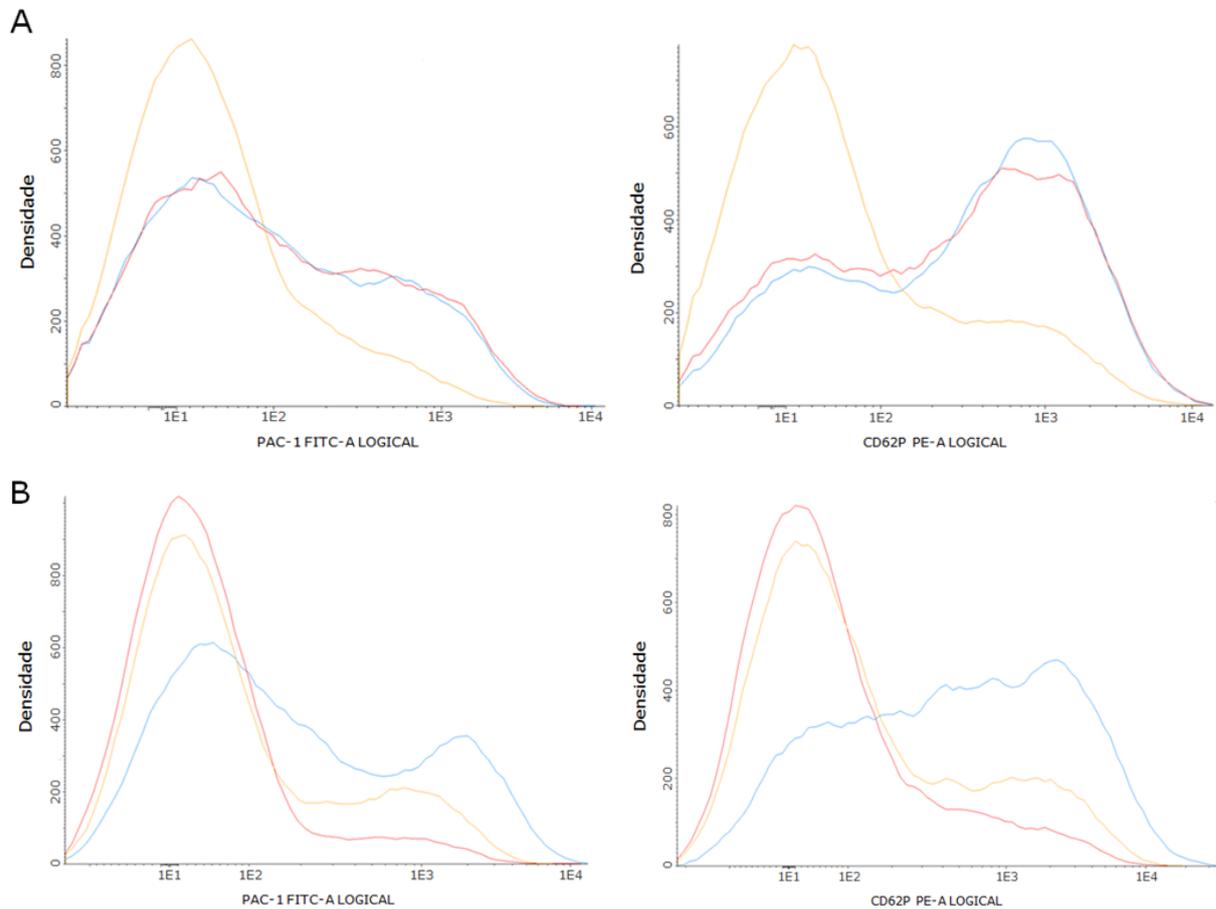
Com o objetivo de elucidar o provável mecanismo pelo qual o Composto **1** inibe a agregação das plaquetas, avaliou-se seu efeito sobre a expressão membranar de marcadores de ativação plaquetária. Como pode ser observado na Tabela 2 e Figura 14, o Composto **1** não foi capaz de inibir a expressão da GpIIb/IIIa e de P-selectina quando na sua melhor CI_{50} (54,8 μ M). No entanto, quando testado na sua concentração máxima (500 μ M), foi capaz de inibir por completo tanto a expressão da GpIIb/IIIa quanto de P-selectina.

Tabela 2 - Porcentagem de inibição da expressão de GpIIb/IIIa (PAC-1) e de P-selectina (CD62P).

Tratamento	Inibição (%)	
	PAC-1	CD62P
Composto 1 (54,8 μ M)	0,0	0,0
Composto 1 (500 μ M)	100,0	100,0

A porcentagem de inibição da expressão de PAC1 e CD62P foi calculada a partir das intensidades de fluorescência médias obtidas após a fusão dos arquivos das duplicatas com a ferramenta *File Merge*.
Composto **1** – menzoquinona. Fonte: A autora.

Figura 14 – Efeito do Composto 1 sobre a expressão membranar de GpIIb/IIIa (PAC-1) e de P-selectina (CD62P) em plaquetas estimuladas por epinefrina.

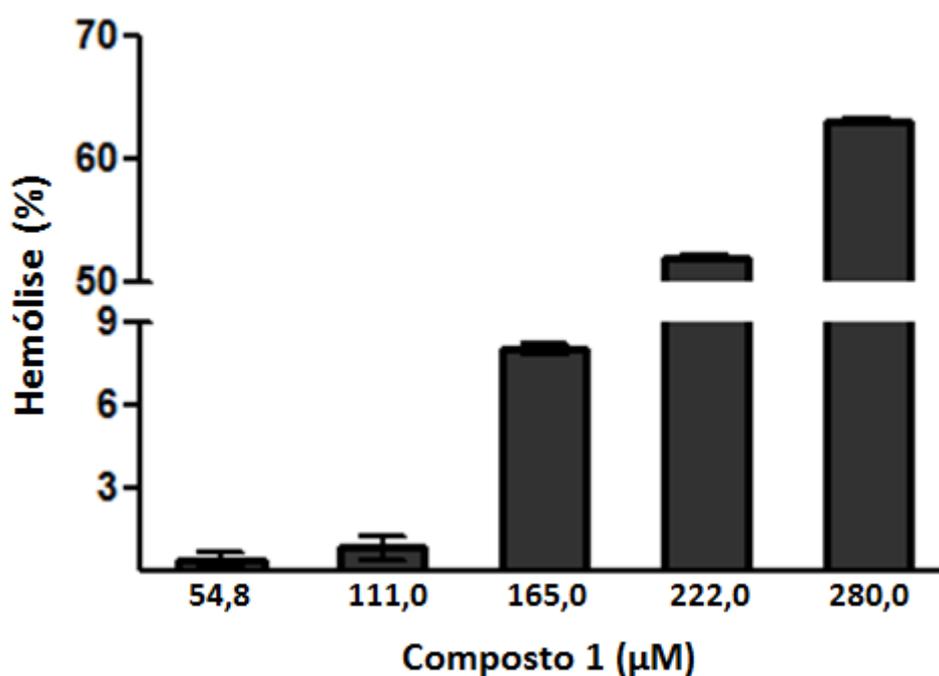


Painel A - Histogramas do efeito do Composto 1 (54,8 μM) sobre a expressão de PAC1 e CD62P. Painel B - Histogramas do efeito do Composto 1 (500 μM) sobre a expressão de PAC1 e CD62P. Laranja – plaquetas tratadas com DMSO 0,5%; Azul – plaquetas tratadas com DMSO 0,5% e estimuladas por epinefrina (5 μg/mL); Vermelho – plaquetas tratadas com o Composto 1 e estimuladas por epinefrina (5 μg/mL). Fonte: A autora.

5.6 EFEITO DO COMPOSTO 1 SOBRE AS HEMÁCIAS

A hemocompatibilidade do Composto 1 foi avaliada por meio da mensuração de hemoglobina liberada pelas hemácias lisadas após o período de incubação de uma hora com diferentes concentrações do composto. Como pode ser observado na Figura 15, o Composto 1 provocou pequena hemólise quando testado nas concentrações de 54,8 μM , 111,0 μM e 165,0 μM ($0,4 \pm 0,2\%$, $0,8 \pm 0,4\%$ e $8,0 \pm 0,2\%$, respectivamente). No entanto, quando testado em concentrações iguais ou superiores a 220,0 μM (quatro vezes a CI_{50}), o Composto 1 provocou intensa hemólise.

Figura 15 – Hemocompatibilidade do Composto 1.



Composto 1 – menzoquinona; Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos individuais. Fonte: A autora.

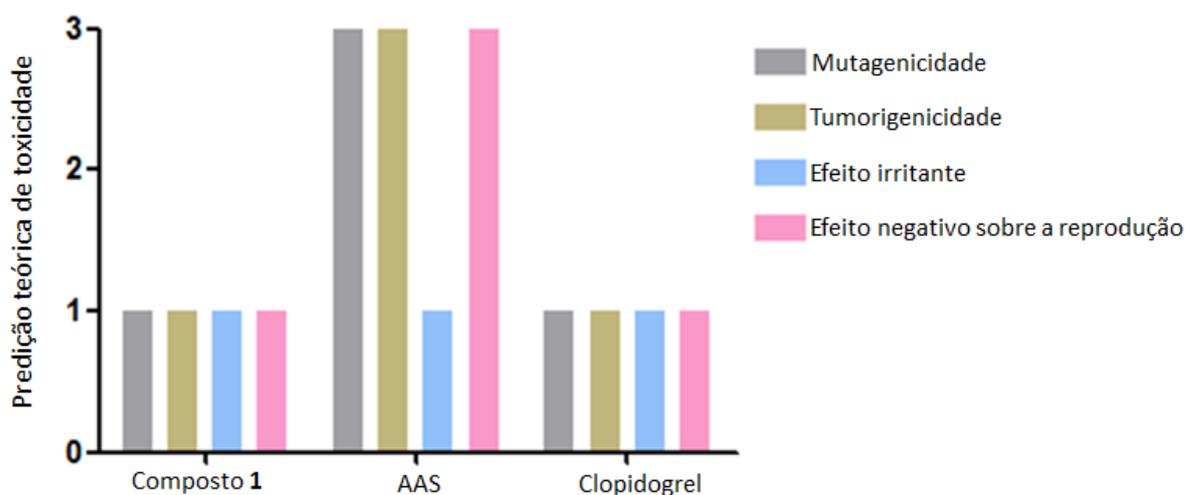
5.7 ESTUDOS *IN SILICO* DO COMPOSTO 1

5.7.1 Predição teórica de toxicidade

A predição teórica de toxicidade, realizada por meio do programa *Osiris® Property Explorer*, sugere que a estrutura do Composto 1 apresenta baixo risco toxicológico em todos

os parâmetros analisados: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritativos e efeito negativo sobre a reprodução (Figura 16). Da mesma forma, o clopidogrel apresentou baixo risco teórico de toxicidade nos parâmetros avaliados. No entanto, o AAS apresenta elevado risco de mutagenicidade, tumorigenicidade e efeito negativo sobre a reprodução.

Figura 16 – Estudo teórico de toxicidade do Composto 1.



AAS – ácido acetilsalicílico; Composto 1 – menzoquinona; 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.

5.7.2 Predição teórica do potencial do Composto 1 de se tornar um fármaco

Por meio do programa *Osiris® Property Explorer* também foram avaliados parâmetros preditivos relacionados ao potencial do Composto 1 vir a se tornar um fármaco (*Druglikeness* e *Drug score*). Os resultados obtidos sugerem que a estrutura do Composto 1 não apresenta um perfil favorável, uma vez que os valores de *Druglikeness* (- 1,56) e *Drug score* (0,22) não se equiparam aos parâmetros estabelecidos pelo programa (Tabela 3). Semelhante ao composto estudado, o AAS também não apresentou valores desejáveis de *Druglikeness* (- 0,48) e de *Drug score* (0,24). Por outro lado, o clopidogrel possui ambos os valores desejáveis.

Tabela 3 – Predição teórica do potencial do Composto 1 se tornar um fármaco.

	<i>Druglikeness</i>	<i>Drug score</i>
Parâmetro	> 0	Próximo de 1
Composto 1	- 1,56	0,22
AAS	- 0,48	0,14
Clopidogrel	1,33	0,74

AAS – ácido acetilsalicílico; Composto 1 – menzoquinona. Fonte: A autora.

5.7.3 Predição teórica da biodisponibilidade oral

Os resultados obtidos a partir da plataforma *online Molinspiration* (Tabela 4) sugerem que a estrutura do Composto 1 apresenta um perfil farmacocinético favorável, uma vez que viola apenas uma das regras de Lipinski e cols. (2001), ele possui *miLogP* superior a 5,0. O clopidogrel e o AAS, dois fármacos administrados por via oral, não violam nenhuma das regras.

Tabela 4 – Propriedades físicoquímicas do Composto 1.

	miLogP	MM	nON	nOHNH	Nviolações
Regra	≤ 5,0	< 500	≤ 10	≤ 5	≤ 1
Composto 1	6,89	424,58	4	1	1
AAS	1,43	180,16	4	1	0
Clopidogrel	4,13	321,82	3	0	0

Composto 1 – menzoquinona; AAS – ácido acetilsalicílico; *miLogP* - coeficiente de partição octanol-água; MM - massa molecular; nON - número de N e O aceptores de ligação de H; nOHNH - número de NH e OH doadores de ligação de H; Nviolações - número de violações. Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A hemostasia é um processo fisiológico com duas principais funções: manter o sangue em seu estado fluido e interromper o sangramento frente a um dano vascular. Para isto, faz-se necessária a inter-relação entre as plaquetas, o endotélio vascular e as proteínas coagulantes. Alterações no sistema hemostático, devido a deficiências hereditárias ou a doenças adquiridas, podem resultar em distúrbios hemorrágicos ou tromboembólicos (AUSTIN, 2017). Atualmente, as DCV representam a principal causa de morte e invalidez no mundo (GROSSE *et al.*, 2016; KLOK; STEVENS *et al.*, 2018; WHO, 2018). No Brasil, estas doenças são responsáveis por mais de 30% do total de mortes e, segundo o cardiômetro (indicador do número de óbitos por DCV da Sociedade Brasileira de Cardiologia), foram registradas mais de 360 mil mortes decorrentes destas doenças no ano de 2019 (SBC, 2019).

O gerenciamento das DCV envolve cuidados preventivos, relacionados aos hábitos de vida do indivíduo, e terapia medicamentosa. A farmacoterapia abrange basicamente fármacos antiagregantes e anticoagulantes que, apesar de eficazes, possuem algumas limitações como variabilidade interpessoal de resposta e risco aumentado de sangramento (ASHORABI; FERNANDEZ, 2019). Devido a isto, é crescente a busca por novas moléculas que apresentem atividade antitrombótica e que sejam não apenas eficazes, mas também clinicamente seguras. Neste contexto, o ambiente marinho, por ser uma fonte rica de moléculas bioativas, vem sendo cada vez mais estudado (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012).

Os organismos marinhos são responsáveis pela produção de uma quantidade inesgotável de metabólitos secundários que, em geral, diferem fundamentalmente dos metabólitos de origem terrestre (MALVE, 2016). Entre os produtos marinhos, as classes mais estudadas são os alcaloides, os ácidos graxos, os peptídeos, as acetogeninas e os terpenoides (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Alguns destes produtos apresentam atividade biológica como antibacteriana (DESBOIS; MEARNS-SPRAGG; SMITH, 2009), antiparasitária (KAHLA-NAKBI *et al.*, 2010), analgésica (SKOV *et al.*, 2007), anticâncer (BRINGMANN *et al.*, 2007) e anticoagulante (MOURA *et al.*, 2014), demonstrando assim que a diversidade química marinha é uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos.

A alga parda *D. menziesii* é uma macroalga marinha endêmica pertencente à ordem Desmarestiales e encontra-se distribuída por toda Península Antártica, incluindo as ilhas adjacentes (GÓMEZ; HUOVINEN, 2015). Diversos compostos já foram isolados desta espécie, dentre eles a menzoquinona (SILVA FILHO, 2018). Estudos anteriores já demonstraram que o composto menzoquinona possui atividade anti-herbívoria e antimicrobiana (ANKISETTY *et al.*, 2004), no entanto, seu efeito sobre a hemostasia não foi descrito até o momento. A pesquisa por novos possíveis agentes terapêuticos com ação sobre a hemostasia vem ao encontro da necessidade de fármacos mais seguros e sem tantos efeitos adversos como os medicamentos atualmente disponíveis no mercado.

Neste contexto, o presente trabalho avaliou o efeito do composto menzoquinona sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana, pois estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que extratos brutos isolados de *D. menziesii* foram capazes de inibir significativamente a agregação plaquetária (MEYER, 2019), o que sugere que compostos isolados desta alga possam apresentar atividade semelhante. Além disto, também foram realizados estudos *in vitro* e *in silico* para avaliar a toxicidade, a biodisponibilidade oral e o potencial geral deste composto se tornar um novo fármaco.

No presente trabalho, na concentração de 500 μM , a menzoquinona não foi capaz de induzir a agregação plaquetária ou a coagulação sanguínea quando testada isoladamente. O composto também não apresentou efeito tóxico sobre as plaquetas, uma vez que não reduziu a viabilidade plaquetária quando comparado aos controles realizados na presença de DMSO 0,5% (Figura 12). Esses resultados indicaram que a menzoquinona poderia ser testada nos modelos experimentais utilizados no presente estudo e que os resultados que foram obtidos não eram provenientes de perda de viabilidade plaquetária ou ativação precoce da hemostasia.

A menzoquinona não foi capaz de prolongar significativamente os tempos de TP e TTPa (Figura 8), sugerindo que a mesma não apresenta atividade sobre a coagulação. Em relação à agregação, o composto foi capaz de inibir significativamente a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados (Figura 9). O efeito inibitório da menzoquinona foi mais potente quando utilizado epinefrina e colágeno como agonistas, obtendo-se uma CI_{50} de $54,8 \pm 2,1 \mu\text{M}$ e de $426,9 \pm 18,4 \mu\text{M}$, respectivamente. Como a menzoquinona apresentou um efeito pouco promissor quando o ADP foi utilizado como agonista, não foi determinada a sua CI_{50} para esse estímulo. Em um estudo realizado por Meyer (2019), que avaliou o efeito do composto plastoquinona, isolado a partir de *D. menziesii*, sobre a hemostasia, verificou-se que este composto, assim como a menzoquinona,

não apresentou atividade anticoagulante, mas foi capaz de inibir significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP ($8,8 \pm 2,2\%$), epinefrina ($10,5 \pm 2,9\%$) e colágeno ($11,3 \pm 5,3\%$), obtendo CI_{50} de $201,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$, $239,7 \pm 9,0 \mu\text{M}$ e $156,9 \pm 5,3 \mu\text{M}$, respectivamente. Ambos os compostos são isoprenoides formados por uma unidade 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona ligada a uma cadeia lateral de nove unidades isoprênicas (TREBST, 1978), no entanto, a plastoquinona possui uma hidroxila ligada ao carbono 7 e a menzoquinona possui um grupo funcional carboxila ligado ao último átomo de carbono da cadeia lateral isoprênica. Dessa forma, sugere-se que as diferenças de intensidade de inibição sobre a agregação observada entre os compostos estejam relacionadas aos diferentes grupos funcionais ligados à cadeia lateral.

A formação de um coágulo envolve a ação simultânea entre a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária. No entanto, apesar destas etapas serem interligadas, os processos e atores envolvidos diferem entre si (GALE, 2011), o que explica o porquê da menzoquinona ter efeito apenas sobre uma das fases da hemostasia. O fato de que o composto testado no presente trabalho apresentou efeito apenas sobre a hemostasia primária é promissor, uma vez que a não inibição simultânea de ambas as vias da hemostasia reduziria o risco de sangramento, efeito adverso preocupante observado nos pacientes em uso contínuo de fármacos antitrombóticos (WEITZ; EIKELBOOM; SAMAMA, 2012).

Apesar de a menzoquinona ter demonstrado efeito inibitório frente a todos os agonistas testados, o perfil das curvas de agregação foram diferentes entre si (Figura 10). Cada agonista utilizado ativa as plaquetas por meio da interação com diferentes receptores e vias de sinalização (KICKLER, 2006). O ADP interage com os receptores P2Y1 e P2Y12 acoplados às proteínas Gq e Gi, respectivamente. O colágeno interage com a glicoproteína plaquetária GpIV e ativa as plaquetas via fosforilação da PLC, mimetizando a via mediada por Gq. A epinefrina, por sua vez, se liga aos receptores α_2 -adrenérgicos que, assim como o receptor P2Y12, está acoplado à proteína Gi, provocando a ativação plaquetária via regulação negativa de cAMP (BROOS *et al.*, 2011). Portanto, com base nas diferentes curvas de agregação obtidas, sugere-se que o composto esteja agindo simultaneamente em mais de uma via de sinalização ou em vias de sinalização comum entre os agonistas testados, resultando nos variados perfis de inibição.

O ensaio de agregometria por transmitância de luz é utilizado mundialmente na avaliação laboratorial da função plaquetária. Neste método, utiliza-se um painel variado de agonistas e, a partir da interpretação das curvas de agregação geradas, é possível se obter informações a respeito de em qual receptor, via de sinalização ou glicoproteína provavelmente encontra-se um defeito (DAWOOD *et al.*, 2012). Além disto, esse teste permite padronizar, a partir de características laboratoriais, o perfil de resposta esperado de um determinado fármaco antiagregante. Por exemplo, quando se avalia o perfil de agregação de pacientes em uso de medicamentos tienopiridínicos (inibidores do receptor P2Y12), observa-se que os mesmos possuem um perfil hipogregante quando utilizado ADP como agonista e um perfil normogregante quando utilizado ácido araquidônico como substrato. De forma contrária, em pacientes que utilizam um fármaco com outro mecanismo de ação, como o AAS (inibidor da ciclooxigenase), observa-se uma curva hipogregante ou ausente de agregação quando o ácido araquidônico é utilizado como substrato, mas uma curva normogregante ou hipogregante quando utilizado ADP como agonista (GURNEY, 2016; ISRAELS, 2015; KOTTKE-MARCHANT; CORCORAN, 2002; PAPP *et al.*, 2014). Portanto, cada distúrbio plaquetário e fármaco utilizado na clínica possui um perfil de resposta característico, o que facilita o seu rastreamento. Assim, por meio de uma comparação com padrões já preestabelecidos, é possível pressupor pelos ensaios de agregometria por qual via um composto desconhecido estaria exercendo seu efeito sobre a agregação.

O composto menzoquinona inibiu fracamente a agregação induzida por ADP, revertendo de maneira pouco expressiva a segunda onda de agregação. Da mesma forma, o composto foi capaz de interferir apenas na segunda onda de agregação quando utilizado colágeno como agonista, no entanto, para esse agonista, a inibição foi mais acentuada e provocou uma reversão quase completa da segunda onda. Quando as plaquetas tratadas com o composto foram estimuladas por epinefrina, houve uma reversão total da segunda onda de agregação e uma reversão parcial da primeira onda (Figura 10). Um conjunto de perfis semelhante ao do presente estudo é encontrado em pacientes com deficiência na sinalização de proteína Gi, proteína associada aos receptores de ADP e epinefrina. Nestes pacientes, observa-se uma redução da segunda onda de agregação quando as plaquetas são estimuladas por ADP e colágeno e uma reversão parcial, e em alguns casos total, da primeira onda de agregação induzida por epinefrina (DAWOOD *et al.*, 2012). Portanto, pode-se sugerir que o efeito inibitório sobre a agregação plaquetária causado pela menzoquinona esteja relacionado com a ação desse composto sobre os atores envolvidos na via de sinalização mediada por Gi.

A proteína G_i possui duas subunidades ($G_{\alpha i}$ e $G_{\beta\gamma i}$) e, devido a isto, é capaz de ativar as plaquetas por meio da interação com diferentes efetores. A subunidade $G_{\alpha i}$ atua regulando negativamente a enzima adenilato ciclase e resultando na diminuição das concentrações intracelulares de cAMP. O cAMP é responsável por controlar as concentrações intracelulares de íons cálcio, portanto, sua inibição resultará em um aumento deste íon e consequentemente ativação das plaquetas (RAND; ISRAELS, 2018). Por outro lado, a subunidade $G_{\beta\gamma i}$ atua estimulando a liberação da enzima PI3K β . A PI3K β opera na fosforilação de diferentes lipídeos de membrana e auxilia na manutenção da conformação ativada da GpIIb/IIIa, glicoproteína essencial para a agregação de plaquetas (GUIDETTI; CANOBBIO; TORTI, 2015). Como pode ser observado, diferentes atores estão envolvidos na ativação plaquetária mediada por proteína G_i . Dessa forma, mais testes serão necessários para identificar em qual efector ou quais efetores a menzoquinona estaria interferindo.

Como mencionado, existem diferentes vias que resultam na ativação de plaquetas. Quando ocorre sinalização suficiente para ativação plaquetária, a glicoproteína GpIIb/IIIa presente na superfície das plaquetas sofre mudança conformacional para sua forma ativada e passa a ter alta afinidade pelo fibrinogênio. O fibrinogênio, por ser uma molécula bivalente, se liga a GpIIb/IIIa presente em diferentes plaquetas formando uma “ponte” entre elas e gerando o agregado plaquetário (BERNDT; METHAROM; ANDREWS, 2014). Ainda, durante o processo de ativação de plaquetas, ocorre liberação do conteúdo granular plaquetário fazendo com que a proteína adesiva P-selectina, antes presente nos grânulos alfa plaquetários, passe a ser expressa na superfície membranar. Na superfície das plaquetas, a P-selectina atua facilitando a adesão de plaquetas e leucócitos ao endotélio vascular e também estabilizando as interações entre o fibrinogênio e a GpIIb/IIIa, permitindo assim, a formação de agregados estáveis (MERTEN; THIAGARAJAN, 2000). Em suma, tanto a forma ativa de GpIIb/IIIa quanto a P-selectina podem ser utilizadas como marcadores de ativação plaquetária.

Deste modo, com o intuito de compreender melhor o provável mecanismo pelo qual a menzoquinona estaria inibindo a agregação plaquetária, investigou-se se o tratamento das plaquetas com o composto diminuía a expressão membranar de P-selectina e a ativação de GpIIb/IIIa. Ao analisar os dados de citometria de fluxo, observou-se que o composto não foi capaz de inibir a expressão de P-selectina e GpIIb/IIIa quando avaliado na sua menor CI_{50} (54,8 μ M) (Figura 14.A), no entanto, na maior concentração testada (500 μ M) foi capaz de

inibir em 100% a expressão de ambos marcadores após estímulo com epinefrina (Figura 14.B). Resultados semelhantes são encontrados em estudo realizado por Xia e cols. (2012), no qual se avaliou o efeito de um composto isolado da planta *Curcuma wenyujin* sobre a expressão de P-selectina. Neste estudo, assim como no presente trabalho, o composto não foi capaz de inibir a expressão membranar de P-selectina quando testado numa concentração próxima a sua CI_{50} (40 μ M), no entanto, foi capaz de inibir significativamente a expressão deste marcador em maiores concentrações (100 e 500 micromolar). Da mesma forma, em um estudo onde se avaliou o efeito dos medicamentos abciximab, tirofiban e roxifiban (antagonistas de GpIIb/IIIa) sobre a associação de PAC-1 com a forma ativada de GpIIb/IIIa, observou-se que o efeito inibitório destes fármacos sobre a ativação de GpIIb/IIIa é concentração dependente (CARON *et al.*, 2002).

Os processos de ativação, secreção e agregação plaquetária são iniciados em locais de lesão vascular ou por meio da exposição a agonistas plaquetários solúveis como o ADP, epinefrina e colágeno (KICKLER, 2006). A compilação dos resultados obtidos com os testes de agregação e citometria de fluxo nos permite sugerir que o composto menzoquinona é capaz de inibir a ativação, a secreção e a agregação plaquetária por vias dependentes de proteína Gi. Contudo, mais testes serão necessários para identificar o mecanismo exato pelo qual o composto está agindo.

Devido à atividade antiagregante promissora do composto menzoquinona, considerou-se interessante avaliar se ele tinha potencial para ser utilizado em futuros testes *in vivo*. Dessa forma, avaliou-se a hemocompatibilidade, a toxicidade e a biodisponibilidade oral deste composto.

Durando a investigação de novos agentes terapêuticos, avaliações a respeito da hemocompatibilidade de um composto se tornam essenciais, pois a biocompatibilidade de um composto com os eritrócitos humanos sugere uma segurança na administração *in vivo* desse futuro fármaco (MOCAN, 2013). Segundo Bauer e cols. (2012), uma hemólise de até 10% é tolerada para a maioria das moléculas candidatas a novos fármacos. Os resultados do presente estudo demonstraram que o composto menzoquinona provocou pequena hemólise em concentrações de até três vezes sua CI_{50} (165 μ M), resultando em percentuais de hemólise inferiores a 10%. No entanto, quando avaliado na concentração de 220 μ M (quatro vezes sua CI_{50}) e concentrações superiores, o composto provocou intensa ruptura da membrana de eritrócitos, resultando em taxas de hemólise superiores a 50% (Figura 15). Esses resultados

sugerem que o composto avaliado possui potencial para futuros ensaios *in vivo*, desde que utilizado em concentrações próximas a sua CI_{50} .

Outra importante ferramenta empregada no desenvolvimento de novos fármacos é o estudo *in silico* de moléculas. A modelagem *in silico*, em que modelos matemáticos permitem simular processos farmacológicos e fisiológicos, funciona como uma compilação dos métodos *in vitro* e *in vivo*, entretanto, ao contrário destes, necessita de menos recurso financeiro e tempo de realização. Estes estudos permitem que o pesquisador inclua uma variedade praticamente ilimitada de parâmetros, dentre eles, a avaliação da estrutura atividade de uma molécula, o potencial risco de um composto apresentar efeito tóxico sobre organismos e também possibilita realizar predições farmacocinéticas. Assim, as técnicas *in silico* oferecem aos cientistas a oportunidade de responder perguntas que, por várias razões, não poderiam ser facilmente elucidadas pelos métodos tradicionais (COLQUITT; COLQUHOUN; THIELE, 2011; SALUM, 2007).

O programa *Osiris® Property Explorer* é uma ferramenta de domínio público, disponível em <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, que permite desenhar a estrutura química de compostos e calcular propriedades importantes para o planejamento de um novo fármaco. Para isto, o software compara a estrutura química do composto a ser estudado com os fragmentos estruturais de mais de três mil fármacos em uso comercial e com outros fragmentos cujo efeito tóxico é conhecido. O pressuposto do programa é que medicamentos comercializados são livres de efeito tóxico, portanto, fragmentos estruturais diferentes destes podem ser considerados como prejudiciais (SANDER, 2019). No presente estudo, os seguintes parâmetros de toxicidade foram avaliados: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução. Os resultados obtidos demonstraram que o composto menzoquinona apresentou baixo risco de toxicidade em todos os parâmetros analisados (Figura 16). Em relação aos fármacos antiagregantes também avaliados, o clopidogrel, assim como a menzoquinona, apresentou baixo risco de toxicidade frente a todos os parâmetros, enquanto o AAS apresentou elevado risco de mutagenicidade, tumorigenicidade e efeito negativo sobre a reprodução.

Por meio do programa *Osiris® Property Explorer* também foram avaliados parâmetros preditivos relacionados ao potencial do composto menzoquinona vir a se tornar um fármaco (*Druglikeness* e *Drug score*). O *Druglikeness* é um valor teórico que representa o

grau de similaridade entre os fragmentos estruturais de um composto com os fragmentos estruturais de fármacos comercializados presentes no banco de dados do programa. Neste caso, valores positivos de *Druglikeness* indicam que a molécula contém em sua estrutura fragmentos que estão frequentemente presentes em medicamentos comerciais e que, portanto, a mesma tem potencial para se tornar um medicamento (SANDER, 2019). A menzoquinona apresentou valores negativos de *Druglikeness* (- 1,56), assim como o AAS (- 0,48) (Tabela 3). Por outro lado, o clopidogrel apresentou valor positivo (1,33). Os resultados insatisfatórios do composto frente a este parâmetro não expressa um caráter negativo, pois mostra que mesmo estruturas não convencionais são capazes de produzir um efeito antiplaquetário significativo.

O *Drug score* relaciona as propriedades de *Druglikeness*, lipofilicidade, solubilidade, massa molecular e risco de toxicidade de um composto em um único valor. Para isto, o programa calcula valores que variam de 0 a 1, e quanto mais próximo do número 1, maior a probabilidade da molécula ter um perfil promissor para se tornar um fármaco (SANDER, 2019). A partir dos dados obtidos, observou-se que o composto menzoquinona apresentou um valor baixo de *Drug score* (0,22), no entanto, este valor foi superior ao do fármaco AAS (0,14) (Tabela 3), que tem sido administrado há mais de 40 anos como um antiplaquetário de excelente eficácia.

Por fim, a predição teórica da biodisponibilidade oral do composto menzoquinona foi avaliada seguindo alguns parâmetros físicoquímicos propostos por Lipinski e cols. (2001). A regra dos cinco de Lipinski estabelece que para uma molécula ser considerada ativa oralmente ela deve apresentar valores para quatro parâmetros múltiplos de cinco: coeficiente de partição octanol-água (LogP) menor ou igual a 5, massa molecular menor ou igual a 500 g/mol, apresentar 10 ou menos grupos aceptores de ligação hidrogênio (nON) e possui cinco ou menos grupos doadores de ligação hidrogênio (nOHNH). Como resultado, a molécula pode violar apenas um destes parâmetros, pois quando um composto viola mais de um parâmetro há uma alta probabilidade de que problemas de absorção sejam encontrados (LIPINSKI *et al.*, 2001). Os medicamentos clopidogrel e AAS não violam nenhum parâmetro proposto por Lipinski, o que justifica o uso deles por via oral. Com relação ao composto menzoquinona, os resultados obtidos a partir do programa *Molinspiration* sugerem que o mesmo apresenta uma boa biodisponibilidade oral, uma vez que viola apenas uma das regras de Lipinski e cols. (2001), ele possui LogP superior a 5,0 (Tabela 4).

A compilação dos resultados do presente estudo mostrou que o composto menzoquinona possui efeito antiagregante, sendo que este efeito está provavelmente

relacionado a uma inibição de vias de ativação plaquetária dependentes de proteína Gi. Ainda, a menzoquinona apresentou baixo risco teórico de toxicidade e favorável biodisponibilidade oral, sugerindo assim, que este composto apresenta potencial para ser utilizado como protótipo no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O composto estudado, quando analisado na ausência de agonistas plaquetários, não provocou a agregação das plaquetas ou a coagulação do sangue;
- O composto menzoquinona não apresentou efeito sobre a hemostasia secundária, uma vez que não prolongou os tempos de TP e TTPa;
- A menzoquinona apresentou atividade antiagregante, pois inibiu de maneira significativa a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados;
- O efeito antiagregante do composto é dependente da concentração, no entanto, não é tempo dependente;
- A menor CI_{50} foi a encontrada quando a epinefrina foi utilizada como agonista e foi de $54,8 \pm 2,1 \mu M$;
- A partir do perfil das curvas de agregação obtidas na presença do composto isolado, sugere-se que a menzoquinona esteja inibindo a agregação plaquetária por vias de sinalização dependentes de proteína G_i ;
- A expressão membranar de P-selectina e a ativação de GpIIb/IIIa foi inibida por completo em plaquetas tratadas com o composto e estimuladas por epinefrina. Ressalta-se que este efeito foi dependente da concentração;
- O composto menzoquinona apresentou baixa toxicidade sobre as plaquetas e sobre as hemácias quando avaliado em testes *in vitro*;
- O composto estudado apresentou baixo risco teórico de mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução;
- O valor teórico de *Druglikeness* demonstrou que os fragmentos estruturais do composto menzoquinona não é semelhante aos fragmentos de fármacos comercializados presentes no banco de dados do programa utilizado. Já os valores de *Drug score*, apesar de baixos, foram semelhantes ao fármaco AAS;
- A menzoquinona apresentou uma biodisponibilidade favorável, sugerindo que a mesma possui potencial para ser administrado por via oral;

Estes resultados evidenciam que compostos provenientes de organismos marinhos têm potencial para serem utilizados como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar os níveis de cAMP de plaquetas por meio de imunensaio;
- Investigar o efeito do composto menzoquinona em modelos de trombose *in vivo*;
- Realizar estudos de modelagem molecular e investigar a relação estrutura x atividade da menzoquinona.

REFERÊNCIAS

- AL-SALAMA, Zaina T.; KEATIN, Gillian M.; KEAM, Susan J. Ticagrelor: A Review in Long Term Secondary Prevention of Cardiovascular Events. **Drugs**. p. 2025-2036. nov. 2017.
- ALVES, Carlos Pereira; ALMEIDA, Carlos Costa; BALHAU, Álvaro Pratas. Capítulo de Cirurgia Vasculiar. In: **Tromboembolismo Venoso: Diagnóstico e Tratamento**. 2015. p. 11-132.
- ANDREWS, Robert K. *et al.* Platelet Interactions in Thrombosis. **Iubmb Life**. p. 13-18. jan. 2004.
- ANGIOLILLO, Dominick J.; BATES, Eric R.; BASS, Theodore A. Clinical profile of prasugrel, a novel thienopyridine. **American Heart Journal**. p. 16-22. ago. 2008.
- ANKISETTY, Sridevi *et al.* Chemical Investigation of Predator-Deterred Macroalgae from the Antarctic Peninsula. **Journal Of Natural Products**. Tampa, p. 1295-1302. jul. 2004.
- ARDLIE, Neville G.; MCGUINNESS, Julie A.; GARRETT, Jillian J. Effect on human platelets of catecholamines at levels achieved in the circulation. **Atherosclerosis**. p. 251-259. dez. 1985.
- ASHOROBI, Damilola; FERNANDEZ, Roberto. **Thrombosis**. Statpearls Publishing, 2019.
- AUSTIN, Steven. Haemostasis. **Medicine**. p. 204-208. abr. 2017.
- BAUER, M. *et al.* Poly (2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymerpoly (ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility. **Macromol Biosci**. v. 12, p.986-998, 2012.
- BERNDT, M. C.; METHAROM, P.; ANDREWS, R. K. Primary haemostasis: newer insights. **Haemophilia**. p. 15-22. mar. 2014.
- BIRIS, N. *et al.* Mapping the binding domains of the alpha(IIb) subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin alpha(IIb)beta(3). **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 270, n. 18, p.3760-3767, 2003.
- BLUNT, John W. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**. p. 1-48. jan. 2003.
- BMJ. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. Jan. 2002.
- BONAR, Roslyn A.; LIPPI, Giuseppe; FAVALORO, Emmanuel J. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. In: PERRY, David J; PASI, K John. **Hemostasis and Thrombosis Protocols: Methods in Molecular Medicine**. Springer, 2017. Cap. 1. p. 3-27.

- BORN, G.V.; CROSS, M.J. Aggregation of blood platelets. **J Physiology**, v.168, p. 178-195, 1963.
- BRANDT, John T. *et al.* A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. **American Heart Journal**. p. 9-16. jan. 2007.
- BRINGMANN, Gerhard *et al.* Large-Scale Biotechnological Production of the Antileukemic Marine Natural Product Sorbicillactone A. **Marine Drugs**. p. 23-30. jun. 2007.
- BROOS, Katleen *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**. p. 155-167. 2011.
- CARON, Alexandre *et al.* Anti-platelet Effects of GPIIb/IIIa and P-Selectin Antagonism, Platelet Activation, and Binding to Neutrophils. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**. p. 296-306. 2002.
- CASTRO, Helena Carla *et al.* Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. p. 321-332. out. 2006.
- CESARMAN-MAUS, Gabriela; HAJJAR, Katherine A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. **British Journal Of Haematology**. p. 307-321. jan. 2005.
- CHANG, Mei-chi *et al.* Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production. **Toxicology And Applied Pharmacology**. p. 287-295. 2012.
- CHAPIN, John C.; HAJJAR, Katherine A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**. p. 17-24. jan. 2015.
- CIMMINO, Giovanni; GOLINO, Paolo. Platelet Biology and Receptor Pathways. **Journal Of Cardiovascular Translational Research**. p. 299-309. jan. 2013.
- CLEMETSON, Kenneth J. Platelets and Primary Haemostasis. **Thrombosis Research**. p. 220-224. jan. 2012.
- COLQUITT, Richard B.; COLQUHOUN, Douglas A.; THIELE, Robert H.. In silico modelling of physiologic systems. **Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology**. p. 499-510. 2011.
- DAWOOD, Ban B. *et al.* Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. **Blood**. p. 5041-5049. dez. 2012.

- DESBOIS, Andrew P.; MEARNS-SPRAGG, Andrew; SMITH, Valerie J. A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Marine Biotechnology**. p. 45-52. 2009.
- ELDREDGE, Joanna B.; SPYROPOULOS, Alex C. Direct oral anticoagulants in the treatment of pulmonary embolism. **Current Medical Research And Opinion**. p. 131-140. jan. 2018.
- FAULKNER, John. Marine natural products. **Natural Product Reports**. p. 1-49. jan. 2001.
- FEITOSA-FILHO, G.S. *et al.* Atualização das Diretrizes em Cardiogeriatría da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**. 112(5):649-705, 2019.
- FELÍCIO, Rafael de; OLIVEIRA, Ana Ligia Leandrini de; DEBONSI, Hosana Maria. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**. São Paulo, p. 39-42. jan. 2012.
- FERREIRA, Cláudia Natália *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações: A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. p. 416-421. 2010.
- FERRONI, Patrizia *et al.* Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation. **Clinica Chimica Acta**. p. 88-91. jan. 2009.
- FRYDMAN, G. H.; PATE, Ka Metcalf; VITSKY, A. Platelets and Hemostasis. **Hematopoietic System Toxicology**. Vol 12-15, p. 60-113. dez. 2017.
- GALE, Andrew J. Current Understanding of Hemostasis. **Toxicologic Pathology**. p. 273-280. 2011.
- GHOSHAL, Kakali; BHATTACHARYYA, Maitree. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. **The Scientific World Journal**. p. 1-16. mar. 2014.
- GOLEBIEWSKA, Ewelina M.; POOLE, Alastair W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Reviews**. p. 153-162. 2015.
- GÓMEZ, Iván; HUOVINEN, Pirjo. Lack of Physiological Depth Patterns in Conspecifics of Endemic Antarctic Brown Algae: A Trade-Off between UV Stress Tolerance and Shade Adaptation?. **Plos One**. Nv, p. 1-21. ago. 2015.
- GOTO, Shinya; TOMITA, Aiko. Antithrombotic Therapy for Prevention of Various Thrombotic Diseases. **Drug Development Research**. p. 568-574. 2013.
- GROSSE, Scott D. *et al.* The economic burden of incident venous thromboembolism in the United States: A review of estimated attributable healthcare costs. **Thrombosis Research**. p. 03-10. jan. 2016.

- GUIDETTI GF, *et al.*, PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis, **Advances in Biological Regulation** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2015.06.001>
- GUIRGUIS-BLAKE, Janelle M. *et al.* Aspirin for the Primary Prevention of Cardiovascular Events: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals Of Internal Medicine**. p. 804-813. 21 jun. 2016.
- GURNEY, David. Platelet function testing: from routine to specialist testing. **British Journal Of Biomedical Science**. p. 10-20. maio. 2016.
- GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, Anllely G. *et al.* Anticancer activity of seaweeds. **Drug Discovery Today**. p. 434-447. fev. 2018.
- HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.h. **Fundamentos em Hematologia**. Artmed, 2018.
- HOU, Yan *et al.* Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. **The Journal Of Biomedical Research**. Bra, p. 437-444. jan. 2015.
- ISRAELS, Sara J. Laboratory testing for platelet function disorders. **International Journal Of Laboratory Hematology**. p. 18-24. jan. 2015.
- JAGADEESWARAN, Pudur *et al.* Animal Models of Thrombosis From Zebrafish to Nonhuman Primates: Use in the Elucidation of New Pathologic Pathways and the Development of Antithrombotic Drugs. **Thrombosis Compendium**. p. 1363-1379. abr. 2016.
- KAHLA-NAKBI, Amel Ben *et al.* Screening of antileishmanial activity from marine sponge extracts collected off the Tunisian coast. **Journal Of Parasitology Researc**. p. 1281-1286. abr. 2010.
- KATZ, Leonard; BALTZ, Richard H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**. p. 155-176. jan. 2016.
- KEI, Anastazia A. *et al.* Antiplatelet Drugs: What Comes Next? **Clinical And Applied Thrombosis/hemostasis**. p. 9-26. fev. 2011.
- KICKLER, T. S. Platelet biology – an overview. **Journal Compilation**, v. 2, p. 79–85, 2006
- KLOK, Frederikus A.; BARCO, Stefano; SIEGERINK, Bob. Measuring functional limitations after venous thromboembolism: A call to action. **Thrombosis Research**. p. 59-62. abr. 2019.
- KLOSER, Heinz; QUARTINO, Maria Liliana; WIENCKE, Christian. Distribution of macroalgae and macroalgal communities in gradients of physical conditions in Potter Cove, King George Island, Antarctica. **Hydrobiologia**. p. 1-17. jan. 1996.

KOTTKE-MARCHANT, Kandice; CORCORAN, George. The laboratory diagnosis of platelet disorders. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**. p. 133-146. fev. 2002.

LANDI, Evaldo P.; MARQUES JÚNIOR, José F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Campinas, p. 39-46. jan. 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.

LORENZI TF. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. 711p.

MAHMOODI, Bakhtawar K. *et al.* Association of Traditional Cardiovascular Risk Factors with Venous Thromboembolism: An Individual Participant Data Metaanalysis of Prospective Studies. **Circulation**. p. 7-16. mar. 2017.

MALVE, Harshad. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**. p. 83-91. mar. 2016.

MANOOK, Miriam *et al.* Innate networking: Thrombotic microangiopathy, the activation of coagulation and complement in the sensitized kidney transplant recipient. **Transplantation Reviews**. p. 119-126. jul. 2018.

MANSUR, Antonio de Padua; FAVARATO, Desidério. Tendências da Taxa de Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil, 1980-2012. **Arq. Bras. Cardiol.** fev. 2016.

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

MEGA, Jessica L; SIMON, Tabassome. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. **The Lancet**. p. 281-291. jul. 2015.

MERTEN, Michael; THIAGARAJAN, Perumal. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. **Journal Of The American Heart Association**. p. 1931-1936. out. 2000.

MEYER, Nathalia Moura. **Avaliação do efeito antitrombótico e anticoagulante de extratos brutos de algas marinhas e seus compostos isolados**. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

MOHAMED, Suhaila; HASHIM, Siti Nadia; RAHMAN, Hafeedza Abdul. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends In Food Science & Technology**. p. 83-96. fev. 2012.

MOLICA, Filippo *et al.* Pannexin- and Connexin-Mediated Intercellular Communication in Platelet Function. **International Journal Of Molecular Sciences**. p. 1-21. abr. 2017.

MONROE, Dougald M.; HOFFMAN, Maureane. What Does It Take to Make the Perfect Clot? **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**. p. 41-48. jan. 2006.

MOURA, Laura de Andrade *et al.* Antiplatelet and Anticoagulant Effects of Diterpenes Isolated from the Marine Alga, *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**. p. 2471-2484. abr. 2014.

MOURA, Laura de Andrade *et al.* Anticoagulation and antiplatelet effects of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal Of Thrombosis And Thrombolysis**. p. 235-240. jan. 2011.

MULLOY, Barbara *et al.* Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacological Reviews**. p. 76-141. jan. 2016.

NORTON, Trevor A.; MELKONIAN, Michael; ANDERSEN, Robert A. Algal biodiversity. **Phycologica**. p. 308-326. 1996.

PAPP, J. *et al.* Antiplatelet effect of acetylsalicylic acid, metamizole and their combination - in vitro and in vivo comparisons. **Clinical Hemorheology And Microcirculation**. p. 1-12. jan. 2014.

PAVÃO, Mauro S. G.. Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. p. 105-112. 2002.

PEREIRA, Naveen L. *et al.* Clopidogrel Pharmacogenetics. **Circulation: Cardiovascular Interventions**. p. 1-11. abr. 2019.

RAND, Margaret L.; ISRAELS, Sara J. Molecular Basis of Platelet Function. In: **Hematology**. Elsevier, 2018. Cap. 125. p. 1870-1884.

RICHMAN, Ilana B.; OWENS, Douglas K. Aspirin for Primary Prevention. **Medical Clinics Of North America**. p. 713-724. jul. 2017.

RODRIGUES, Evandra Straza *et al.* Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. Três Corações, p. 218-233. 2012.

SALEM, Joe-elie; SABOURET, Pierre; FUNCK-BRENTANO, Christian. Pharmacology and mechanisms of action of new oral anticoagulants. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. p. 1-11. fev. 2015.

SANDER T. Actelion Pharmaceuticals Ltd., Switzerland. 2019. Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em: 21 de julho de 2019

SILVA FILHO, Isac José. **Estudo químico bioguiado da macroalga marinha da Antártica *Desmarestia menziesii* (Phaeophyceae) para isolamento de substâncias com atividades**

biológicas. 2018. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2018.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Cardiômetro: Morte por Doenças Cardiovasculares no Brasil**. 2019. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2019

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes Brasileiras de Antiagregantes Plaquetários e Anticoagulantes em Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 3, p.1-95, set. 2013.

SHI, Qimin *et al.* Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. **Carbohydrate Research**. p. 1-9. dez. 2017.

SKOV, Michael J. *et al.* Nonclinical Safety of Ziconotide: An Intrathecal Analgesic of a New Pharmaceutical Class. **International Journal Of Toxicology**. p. 411-421. set. 2007.

SPRÜGE, Maximilian I *et al.* Heparin for prophylaxis of venous thromboembolism in intracerebral haemorrhage. **Journal Of Neurology, Neurosurgery, And Psychiatry**. p. 1-19. fev. 2019.

STEVENS, Bryce *et al.* Os Custos das Doenças Cardíacas no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol**. p. 29-36. jul. 2018.

SUGIDACHI, A. *et al.* The greater in vivo antiplatelet effects of prasugrel as compared to clopidogrel reflect more efficient generation of its active metabolite with similar antiplatelet activity to that of clopidogrel's active metabolite. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**. p. 1545-1551. abr. 2007.

SURIN, William R.; BARTH WAL, Manoj K.; DIKSHIT, Madhu. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: Emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. **Thrombosis Research**. p. 786-803. ago. 2007.

SYRACUSE, Stephanie Milis. **Avaliação do efeito de compostos isolados da alga marinha Dictyopteris jolyana sobre a agregação plaquetária**. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

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

TREBST, A. Plastoquinones in Photosynthesis. **Philosophical Transactions Of The Royal Society**. p. 591-599. 1978.

TZORAN, Inna; HOFFMAN, Ron; MONREAL, Manuel. Hemostasis and Thrombosis in the Oldest Old. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**. p. 1-8. jun. 2018.

VERSTEEG, Henri H. *et al.* New Fundamentals in Hemostasis. **Physiological Reviews**. p. 327-358. jan. 2013.

VILLAR, Rosa M *et al.* Evaluation of the effects of several zoanthamine-type alkaloids on the aggregation of human platelets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. p. 2301-2306. maio 2003.

XIA, Quan *et al.* Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential Oil. **Thrombosis Research**. p. 409-414. maio 2012.

WALLACE, Michael A. *et al.* Alpha-Adrenergic Stimulation of Phosphatidyl inositol Synthesis in Human Platelets as an Alpha-2 Effect Secondary to Platelet Aggregation. **Journal Of Cellular Biochemistry**. p. 213-220. jan. 1982.

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

WEITZ, Jeffrey I.; EIKELBOOM, John W.; SAMAMA, Meyer Michel. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**. p. 120-151. fev. 2012.

WHO - World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, 2018.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Ana Carolina Rabello de Moraes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 32934714.0.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 831.351

Data da Relatoria: 13/10/2014

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 831.351

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto mostra-se adequado teórica e 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:

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 831.351

texto as informações sugeridas pelo relator.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 14 de Outubro de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

ANEXO B – Trabalhos Apresentados em Congressos



CONGRESSO
BRASILEIRO
de HEMATOLOGIA,
HEMATOPATIA
e TERAPIA CELULAR
6 a 9 de novembro de 2019 - Rio de Janeiro/RJ/Brasil

CERTIFICADO 2019

Certificamos que o trabalho intitulado "Avaliação da atividade antitrombótica de uma menzoquinona isolada da alga parda *Desmarestia menziesii*" de autoria de **Juques B, Arenhart T, Philippus AC, Zatzell GA, Martins AP, Neto PC, Horta PA, Falkenberg MB, Moraes ACR** foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – **HEMO 2019**, realizado no período de 6 a 9 de novembro de 2019 no Rio de Janeiro/RJ, na categoria painel com visita guiada (Painel 428).

Rio de Janeiro, 09 de novembro de 2019.



Dante Largini Jr.
Presidente do CBHHT



Angelo Medeiros
Presidente do SBHHT



Associação Brasileira
de Hematologia, Hemoterapia
e Terapia Celular