



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

Carine Bollis Frozza

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE DE UMA SÉRIE DE
PIRANOCUMARINAS E CROMENOS SINTÉTICOS**

FLORIANÓPOLIS

2021

Carine Bollis Frozza

**Avaliação da atividade antiagregante de uma série de piranocumarinas e cromenos
sintéticos**

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

Florianópolis

2021

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

Frozza, Carine

Avaliação da atividade antiagregante de uma série de
piranocumarinas e cromenos sintéticos / Carine Frozza ;
orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes, 2021.
112 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Antiagregantes. 3. Piranocumarinas. 4.
Cromenos. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

Carine Bollis Frozza

Avaliação da atividade antiagregante de uma série de piranocumarinas e cromenos sintéticos

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

Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg
Universidade Federal de Santa Catarina

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

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

Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes
Orientadora

Florianópolis, 26 de Julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Gelson e Edevandra que são exemplos de integridade, amor e persistência, que não medem esforços para permitir que eu busque todos os meus objetivos de vida. Amo vocês mais que tudo, que Deus os faça eternos.

À minha irmã Kemilly e meu afilhado Tayrone que despertam em mim a vontade de ser uma pessoa melhor e buscar um mundo mais justo. Vocês são o meu melhor presente.

Aos meus avós que sempre apoiam todas as decisões, vibram, torcem, e choram comigo, vocês são exemplos de honestidade e resiliência, eu tenho muito orgulho de vocês.

A minha orientadora Professora Dr.^a Ana Carolina Rabello de Moraes, que mesmo ante as minhas limitações e falhas sempre foi paciente, generosa e atenciosa. Agradeço pela oportunidade e sinto-me extremamente honrada em ter aprendido com você.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

A minha amiga de longa data Larissa por me acolher, compartilhar comigo minhas angústias, alegrias e vitórias. Seu apoio foi incondicional para a concretização desse projeto.

Ao doutorando Erlon Martin e seus orientadores pela confiança e parceria.

Aos meus colegas Fernanda, Lucas, às mestrandas e doutorandas do LAPEO e LOEH pelo companheirismo. Vocês tornaram a jornada mais leve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa.

À toda equipe de coleta do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago pela paciência, compreensão e ajuda durante toda a caminhada. Conviver com pessoas como vocês aqueceu de afeto o meu peito.

A todos que de uma forma ou outra colaboraram para que eu pudesse realizar esse sonho, minha gratidão eterna.

“A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A hemostasia é o recurso biológico responsável pela manutenção do sangue em estado fluído nos vasos sanguíneos em condições fisiológicas. Eventos trombóticos tem impacto direto sobre a morbimortalidade mundial. Antiagregantes e anticoagulantes são essenciais na terapêutica medicamentosa para tratar distúrbios da hemostasia, porém, as terapias convencionais apresentam inúmeros efeitos adversos o que torna seu uso limitado. O desenvolvimento de compostos sintéticos foi um marco na busca por novos fármacos, diante disso, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a ação de uma série de piranocumarinas e cromenos sintéticos sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana. Previamente à realização de todos os experimentos, as amostras de plasma pobre ou rico em plaquetas foram incubadas por 5 minutos a 37 °C com os compostos ou com dimetilsulfóxido 0,5% v/v (controle). Os resultados dos ensaios de agregação plaquetária por turbidimetria empregando-se difosfato de adenosina (ADP) e epinefrina como agonistas demonstraram que as duas séries de compostos sintéticos inibiram significativamente a agregação plaquetária estimulada pelos mesmos. A ação dos compostos sobre as vias da coagulação foi elucidada pelos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Nenhuma composto causou prolongamento clinicamente significativo do TP e do TTPa. Estudos *in silico* demonstraram que piranocumarinas teriam maior probabilidade de desenvolver eventos de toxicidade quando comparadas aos cromenos. Os cromenos SEM 39, 40 e 42 foram selecionados para o prosseguimento dos testes devido à sua similaridade estrutural, bem como, seu efeito promissor sobre a agregação das plaquetas e devido a sua baixa toxicidade teórica. O método de exclusão por azul de *Trypan* demonstrou que nenhum dos cromenos selecionados diminuiu significativamente a viabilidade das plaquetas. Os três cromenos induziram respostas à agregação dependentes da concentração testada, mas não do tempo de incubação. As CI_{50} foram determinadas utilizando-se o ADP, a epinefrina e o colágeno como agonistas; as melhores CI_{50} do SEM 39, 40 e 42 foram obtidas quando as plaquetas foram estimuladas com epinefrina sendo de $94,19 \pm 1,47 \mu\text{M}$, $61,53 \pm 1,80 \mu\text{M}$, $110,00 \pm 2,07 \mu\text{M}$, respectivamente. Os perfis das curvas de agregação sugerem que o provável mecanismo de ação dos três cromenos está relacionado com a inibição da amplificação de sinal pró-agregante (secreção de grânulos ou produção de tromboxano A2 (TxA2)). Os três cromenos reduziram de maneira efetiva a ativação plaquetária ao reduzir a expressão de GpIIb/IIIa ativada. Os compostos SEM 40 e 42 não inibiram de forma expressiva a secreção de grânulos α (P-selectina), sugerindo que a inibição da secreção de grânulos não é o principal mecanismo de ação destes compostos. Os três compostos selecionados inibiram significativamente a agregação estimulada por ácido araquidônico, mesmo em uma concentração inferior à sua CI_{50} ($31,2 \mu\text{M}$). A compilação de todos os resultados sugere que os cromenos SEM 39, 40 e 42 podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos antiagregantes, uma vez que, não se apresentaram tóxicos para as plaquetas e seu possível mecanismo de ação está relacionado com a inibição da via do TxA2.

Palavras-chave: Hemostasia; Piranocumarinas; Cromenos; Antiagregante; Tromboxano A2.

ANTIPLATELET ACTIVITY OF A SERIES OF SYNTHETIC PYRANOCUMARINES AND CHROMENES

Hemostasis is the biological resource responsible for maintaining blood in a fluid state in blood vessels under physiological conditions. Thrombotic events have a direct impact on worldwide morbidity and mortality. Antiaggregants and anticoagulants are essential in drug therapy to treat hemostasis disorders, however, conventional therapies have numerous adverse effects, which makes their use limited. The development of synthetic compounds was a milestone in the search for new drugs, therefore, the general objective of this study was to evaluate the action of pyranocoumarins and synthetic chromenes on platelet aggregation and human blood coagulation. Prior to carrying out all experiments, the plasma samples that were poor or rich in platelets were incubated for 5 minutes at 37 °C with the compounds or with 0.5% v/v dimethylsulfoxide (control). The results of platelet aggregation assays by turbidimetry using adenosine diphosphate (ADP) and epinephrine as agonists demonstrated that the two series of synthetic compounds significantly inhibited platelet aggregation stimulated by them. The action of the compounds on the coagulation pathways was elucidated by the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) tests. No compound caused clinically significant prolongation of PT and APTT. In silico studies have shown that pyranocoumarins are more likely to develop toxicity events when compared to chromenes. Chromene SEM **39**, **40** and **42** were selected for further testing due to their structural similarity, as well as their promising effect on platelet aggregation and due to their low theoretical toxicity. The Trypan blue exclusion method demonstrated that none of the selected chromenes significantly decreased platelet viability. The three chromenes induced aggregation responses dependent on the concentration tested, but not on the incubation time. IC₅₀ were determined using ADP, epinephrine and collagen as agonists; the best IC₅₀ of SEM **39**, **40** and **42** were obtained when platelets were stimulated with epinephrine being $94.19 \pm 1.47 \mu\text{M}$, $61.53 \pm 1.80 \mu\text{M}$, $110.00 \pm 2.07 \mu\text{M}$, respectively. The profiles of the aggregation curves suggest that the probable mechanism of action of the three chromenes is related to the inhibition of the amplification of the pro-aggregant signal (secretion of granules or production of thromboxane A₂ (TxA₂)). The three chromenes effectively reduced platelet activation by reducing the expression of activated GpIIb/IIIa. Compounds SEM **40** and **42** did not significantly inhibit α granule secretion (P-selectin), suggesting that inhibition of granule secretion is not the main mechanism of action of these compounds. The three selected compounds significantly inhibited arachidonic acid-stimulated aggregation, even at a concentration lower than their IC₅₀ (31.2 μM). The compilation of all the results suggests that the SEM **39**, **40** and **42** chromenes can be used as prototypes for anti-aggregating drugs, since they were not toxic to platelets and their possible mechanism of action is related to the inhibition of the blood pathway. TxA₂.

Keywords: Hemostasis; Pyranocoumarins; Chromenes; Antiaggregant; Thromboxane A₂.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substituintes químicos das piranocumarinas e cromenos da série “SEM” ..	45
Tabela 2 - Efeito dos compostos (500 μ M) da série “SEM” sobre a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP (10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL).	56
Tabela 3 - Efeito dos compostos (500 μ M) da série “SEM” sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	58
Tabela 4 - Predição teórica da toxicidade dos compostos da série “SEM” determinada com auxílio do programa Osiris [®] Property Explorer	59
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos das piranocumarinas e cromenos da série “SEM” calculados pelo programa SwissADME	61
Tabela 6 - Efeito dos compostos SEM 39 , 40 e 42 em relação ao tempo de incubação (5 e 15 minutos)	67
Tabela 7 - Porcentagem de inibição da expressão de GpIIb/IIIa ativada (PAC-1) e de P-selectina (CD62P) pelos compostos SEM 39 , SEM 40 e SEM 42	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura plaquetária.....	22
Figura 2 - Interações da fase de adesão plaquetária	25
Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária	26
Figura 4 - Cascata da coagulação	32
Figura 5 - Estrutura química geral das cumarinas	40
Figura 6 - Estrutura química geral das piranocumarinas.....	40
Figura 7 - Estrutura química geral dos cromenos.....	41
Figura 8 - Estrutura química básica das piranocumarinas e cromenos da série “SEM”	45
Figura 9 - Representação esquemática de uma curva de agregação plaquetária.....	47
Figura 10 - Dot-plots e histogramas representativos da análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo	54
Figura 11 - Efeito dos cromenos (500 μ M) sobre a viabilidade de plaquetas.....	62
Figura 12 - Curvas concentração resposta dos três compostos selecionados utilizando-se difosfato de adenosina (ADP - 10 μ M) como agonista.....	64
Figura 13 - Curvas concentração resposta dos três compostos selecionados utilizando-se epinefrina (5 μ g/mL) como agonista.....	65
Figura 14 - Curvas concentração resposta dos três compostos selecionados utilizando-se colágeno (2 μ g/mL) como agonista.....	66
Figura 15 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP (10 μ M) com diferentes concentrações do SEM 39	68
Figura 16 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina (5 μ g/mL) com diferentes concentrações do SEM 39	69
Figura 17 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP (10 μ M) com diferentes concentrações do SEM 40	70
Figura 18 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina (5 μ g/mL) com diferentes concentrações do SEM 40	71
Figura 19 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP (10 μ M) com diferentes concentrações do SEM 42	72
Figura 20 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina (5 μ g/mL) com diferentes concentrações do SEM 42	73

Figura 21 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por colágeno (2µg/mL) com diferentes concentrações dos cromenos da série “SEM”	74
Figura 22 - Efeito dos compostos SEM 39, SEM 40 e SEM 42 sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico.....	76
Figura 23 - Metabolismo do ácido araquidônico.....	90

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -Cálculo da viabilidade plaquetária51

Equação 2 - Cálculo da porcentagem de inibição a partir da intensidade de fluorescência..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AT	Antitrombina
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca ⁺²	Íons de cálcio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CD	Cluster de diferenciação
CEPSH	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos
CH ₃	Metila
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
COX	Ciclooxigenase
DAG	1,2-diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOAC	Anticoagulante oral de ação direta
EP	Embolia pulmonar
EUA	Estados Unidos da América
F	Fator
FT	Fator tecidual
FvW	Fator de von Willebrand

GP	Glicoproteína
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
HNF	Heparina não fracionada
HU	Hospital Universitário
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato
K ⁺	Íons de potássio
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
MeO	Metoxila
Mg ²⁺	Magnésio
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor de ativador do plasminogênio-1
PAR	Receptor ativado por protease
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Proteína C
PDF	Produto de degradação da fibrina
PGGFar	Programa de Pós-graduação em Farmácia
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PI3K β	Fosfatidilinositol 3-quinase β
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC γ 2	Fosfolipase C γ 2
PM	Peso molecular
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas

PS	Proteína S
R	Radical
RNI	Razão normalizada internacional
SUS	Sistema Único de Saúde
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado por trombina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TLR9	Receptor 9 do tipo pedágio
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador de plasminogênio do tipo tecidual
TPSA	Área de superfície polar topográfica
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	Trombose venosa profunda
TxA2	Tromboxano A2
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador
α -2AP	α -2 antiplasmina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 HEMOSTASIA.....	21
3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA	21
3.2.1 Plaquetas	21
3.2.2 Endotélio vascular	23
3.2.3 Adesão plaquetária	24
3.2.4 Ativação plaquetária	25
3.2.5 Secreção plaquetária	28
3.2.6 Agregação plaquetária	29
3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA	30
3.3.1 Cascata de coagulação sanguínea.....	30
3.3.2 Fibrinólise.....	33
3.4 TROMBOSE.....	34
3.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA TROMBOSE.....	35
3.6 CUMARINAS	39
3.7 PIRANOCUMARINAS	40
3.8 CROMENOS	41
3.9 COMPOSTOS SINTÉTICOS.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
4.2 PARTICIPANTES E COLETA DE AMOSTRAS	43
4.3 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS	43
4.4 ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	46
4.5 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	48
4.6 PREDIÇÃO TEÓRICA DE TOXICIDADE E BIODISPONIBILIDADE ORAL ...	49
4.7 CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DOS COMPOSTOS.....	49

	16
4.8 VIABILIDADE PLAQUETÁRIA.....	50
4.9 DETERMINAÇÃO DO EFEITO CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (CI ₅₀)	51
4.10 DETERMINAÇÃO DO EFEITO TEMPO-RESPOSTA.....	51
4.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO MEMBRANAR DE GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA.....	51
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	56
5.1 AÇÕES DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM” SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	56
5.2 AÇÃO DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM” SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	57
5.3 PREDIÇÃO TEÓRICA DE TOXICIDADE E BIODISPONIBILIDADE ORAL DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM”	59
5.4 AÇÃO DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM” SOBRE A VIABILIDADE DAS PLAQUETAS.....	62
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM RELAÇÃO À SUA CONCENTRAÇÃO E AO TEMPO DE INCUBAÇÃO	63
5.5.1 Avaliação do efeito concentração-resposta e determinação da CI₅₀ dos compostos selecionados	63
5.5.2 Determinação do efeito tempo-resposta dos compostos selecionados.....	66
5.6 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS	67
5.7 ATIVIDADE DO SEM 39, 40 E 42 SOBRE A EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA	74
5.8 AÇÃO DOS COMPOSTOS SEM 39, SEM 40 E SEM 42 SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR AA.....	75
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	92
8 PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS	94

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS 109

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é o recurso biológico responsável por interromper o sangramento em um local de lesão ao mesmo tempo que mantém normal o fluxo sanguíneo nas regiões que não foram afetadas. Os mecanismos hemostáticos compreendem eventos bioquímicos e mecânicos que atuam em harmonia para permitir uma produção ágil de coágulos, delimitação da área afetada, bem como possibilitar a dissolução do trombo quando o endotélio for reparado (GALE, 2011; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017).

A trombose pode ser definida como um distúrbio patológico decorrente da ativação e disseminação inadequada dos componentes hemostáticos pró-coagulantes que abrange tanto o sistema venoso como o sistema arterial do organismo (BANE; GAILANI, 2014). A trombose arterial é principalmente desencadeada pela formação de agregados plaquetários, sendo responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) como o infarto agudo do miocárdio (IAM) (FREDENBURGH; WEITZ, 2018; HOFFMAN, 2019). Coágulos venosos são compostos principalmente por hemácias e fibrina e, geralmente, são os desencadeadores da trombose venosa profunda (TVP) e da embolia pulmonar (EP) (MYERS et al., 2020).

Eventos trombóticos tem impacto direto sobre a morbimortalidade mundial. Mais de 10 milhões de mortes são computadas todo ano devido as doenças do aparelho circulatório, destes números, estimam-se que meio milhão de mortes são oriundas da União Europeia (UE) (KOENIG-OBERHUBER; FILIPOVIC, 2016).

Antiagregantes e anticoagulantes são essenciais na terapêutica medicamentosa atual, uma vez que diminuem o risco de trombose e previnem doenças desencadeadas pelo desequilíbrio hemostático (LORGA FILHO et al., 2013).

Os antiagregantes como o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel são uma das terapias medicamentosas mais utilizadas para prevenir eventos trombo-oclusivos isquêmicos e complicações secundárias decorrentes de distúrbios vasculares. Embora tenham evoluído, as terapias antiagregantes ainda se apresentam com numerosas limitações como a variabilidade na resposta individual e o risco aumentado de sangramentos (WALLER; SAMPSON, 2018; XIANG et al., 2019).

Anticoagulantes como os antagonistas da vitamina K (varfarina) são alguns dos fármacos mais prescritos na prática clínica. Usados para o tratamento e prevenção do

tromboembolismo venoso, esses medicamentos tem como mecanismo de ação a inibição de componentes sanguíneos vinculados à execução da hemostasia, por esse motivo, pacientes anticoagulados tem significativas chances de desenvolverem sangramentos graves (BANE; GAILANI, 2014).

Diante das numerosas limitações que as terapias convencionais para tratamento de doenças trombóticas apresentam e tendo em vista o aumento no número da população idosa, o que está associado a uma maior incidência de distúrbios tromboembólicos, é de suma importância a busca por novos protótipos farmacológicos que possam apresentar menos efeitos adversos assim como, eventualmente mecanismos de ação distintos dos fármacos já existentes no mercado (BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018; BROUSSALIS et al., 2014).

Produtos naturais sempre foram uma importante fonte de novas moléculas com potenciais farmacológicos. Porém, devido às complicações econômicas e químicas em desenvolver fármacos a partir de moléculas naturais, estratégias foram desenvolvidas com o intuito de aprimorar a busca por novos protótipos farmacológicos, dessa forma, a química combinatória ganhou cada vez mais espaço no mercado farmacêutico (SANGI, 2016; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O desenvolvimento de compostos sintéticos foi um marco na busca por novos fármacos. A construção de séries inteiras de substâncias químicas com pequenas modificações estruturais e diferentes graus de complexidade possibilitou compreensões mais aprofundadas sobre relação estrutura-atividade além de agilizar o tempo de estudo (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Perante o exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o comportamento biológico de piranocumarinas e cromenos sintéticos sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de piranocumarinas e cromenos sintéticos sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação dos compostos sintéticos das duas classes frente à agregação plaquetária utilizando o difosfato de adenosina (ADP) e a epinefrina como agonistas;
- Determinar os efeitos dos compostos sintéticos sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa);
- Realizar a análise de parâmetros teóricos preditivos de toxicidade e de biodisponibilidade oral dos compostos por meio de modelos computacionais;
- Selecionar os compostos sintéticos com melhor ação antiagregante e menor toxicidade prevista, e verificar seu efeito sobre a viabilidade de plaquetas;
- Selecionar os compostos sintéticos com melhor potencial antiagregante e avaliar os seus efeitos sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico (AA);
- Analisar se a atividade dos compostos selecionados é dependente do tempo de tratamento e da concentração do composto, bem como determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) dos compostos na agregação induzida por ADP, epinefrina e colágeno;
- Investigar o efeito dos compostos sintéticos com melhor atividade antiagregante sobre a ativação e secreção plaquetária.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é o recurso biológico responsável pela manutenção do sangue em estado fluído nos vasos sanguíneos em condições fisiológicas (OLAS; BRYŚ, 2019). Os mecanismos hemostáticos compreendem eventos bioquímicos e mecânicos que atuam em harmonia para permitir a produção ágil de coágulos onde a integridade do vaso estiver lesada, delimitar a extensão dos coágulos e possibilitar a dissolução do trombo, quando o endotélio for reparado (TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017; ZAIDI; GREEN, 2019).

Os segmentos responsáveis pelo processo de hemostasia são as plaquetas, fatores e inibidores da coagulação, vasos sanguíneos e componentes fibrinolíticos, que atuam simultaneamente para interromper de forma rápida e eficaz o sangramento. Didaticamente, a interação desses componentes pode ser dividida em três fases: hemostasia primária, caracterizada pela interação das plaquetas com a parede vascular lesada e consequente formação de um tampão plaquetário, com o intuito de cessar a perda sanguínea; hemostasia secundária, que tem por função produzir fibrina a fim de estabilizar o tampão plaquetária formado; e a fibrinólise, responsável por degradar a fibrina e dissolver o coágulo, evitando assim, complicações trombóticas (HOFFBRAND; HOSS, 2013; LEONARDI, 2019; ZAIDI; GREEN, 2019).

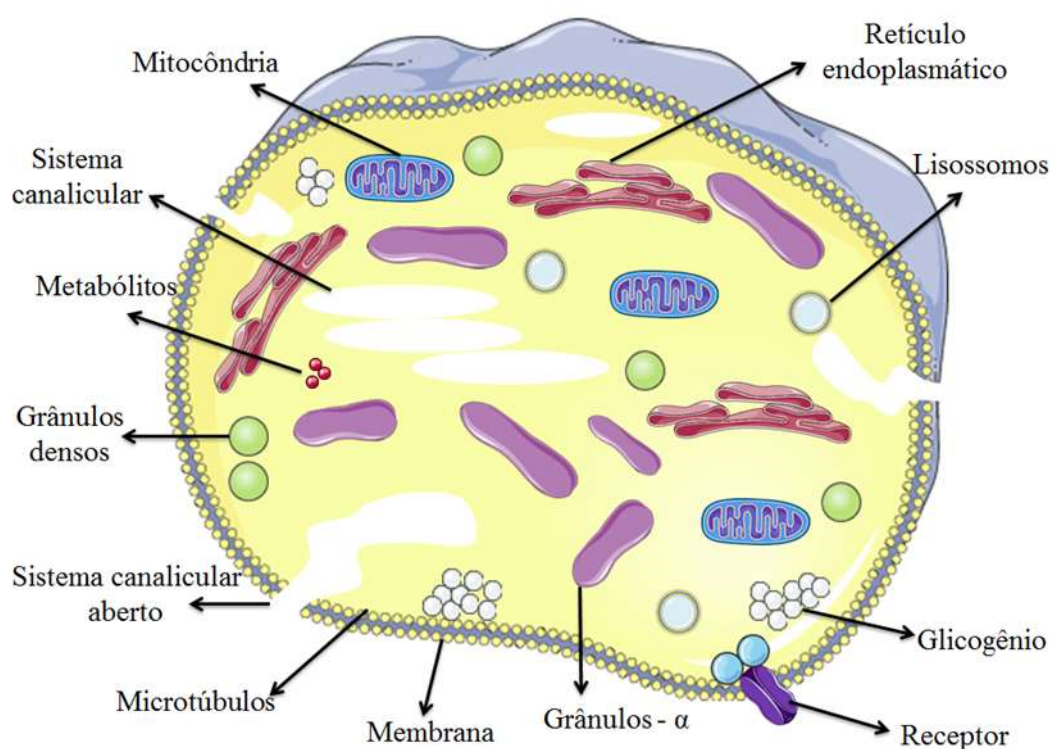
3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA

3.2.1 Plaquetas

Por meio da estimulação do hormônio trombopoetina, dá-se a maturação dos megacariócitos que originam a partir de suas extremidades as plaquetas. As plaquetas são células com formato discoide, possuem diâmetro de 1 a 4 μm , e vida útil entre 7 e 10 dias, seguindo para sua eliminação pelo baço e fígado (HOFFBRAND; MOSS, 2013; QUEIROZ et al., 2017). Em um indivíduo adulto saudável, são originadas 100 bilhões de plaquetas novas ao dia, convertendo-se em uma contagem de aproximadamente $150-400 \times 10^9$ plaquetas/L (OLAS; BRYŚ, 2019).

Embora anucleadas, as plaquetas possuem inúmeras estruturas funcionais, características de células completas, que lhe permitem consideráveis atuações no organismo, integrando, além da hemostasia, os processos de cicatrização de feridas e promoção e inibição de inflamações (Figura 1) (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2017). Quanto a sua composição estrutural, as plaquetas podem ser divididas em três zonas: zona periférica, zona do sistema de microtúbulos e zona das organelas (MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2017).

Figura 1 - Estrutura plaquetária



Fonte: A autora.

A zona periférica compreende o glicocálix, a membrana plasmática e o citoesqueleto. O glicocálix é uma estrutura formada por glicoproteínas e glicolípídeos, cuja principal função é atuar como uma barreira, a fim de impedir a agregação espontânea entre plaquetas. Já a membrana plasmática é uma das estruturas essenciais para a sinalização plaquetária, onde estão acopladas inúmeras glicoproteínas de membrana (Gp) e receptores acoplados à proteína G; além disso, sua constituição fosfolipídica contribui como subproduto para a ativação de diversos fatores presentes na

cascata de coagulação. Por fim, o citoesqueleto é o responsável pela manutenção da forma discoide e integridade celular das plaquetas em repouso (CASTRO, 2006; HARTWIG, 2013; THOMAS, 2019).

A zona dos microtúbulos é composta pelo sistema canalicular aberto e sistema tubular denso. O primeiro, acoplado à superfície plaquetária, é uma extensão da membrana plasmática e atua interligando o meio extracelular com a porção interna da plaqueta podendo, também, servir de caminho oposto, contribuindo dessa maneira, para a liberação do conteúdo granular presente no citoplasma plaquetário. Além disso, ao ocorrer a ativação plaquetária, a modificação estrutural demanda um aumento da área de superfície da plaqueta, esse aumento é fornecido pelos “reservatórios” de membrana plasmática que formam o sistema canalicular aberto. O sistema tubular denso, oriundo do retículo endoplasmático, é responsável pelo armazenamento intracelular de íons de cálcio (Ca^{+2}), essenciais para a plaqueta desempenhar o seu papel na agregação (CASTRO, 2006; POLL; PARKER, 2020; THOMAS, 2019).

Na porção das organelas, estão dispostos constituintes celulares como mitocôndrias, além dos grânulos- α , os grânulos densos, os lisossomos e os grânulos T, que têm por finalidade secretar para o meio extracelular substâncias primordiais para a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (POLL; PARKER, 2020; THOMAS, 2019).

3.2.2 Endotélio vascular

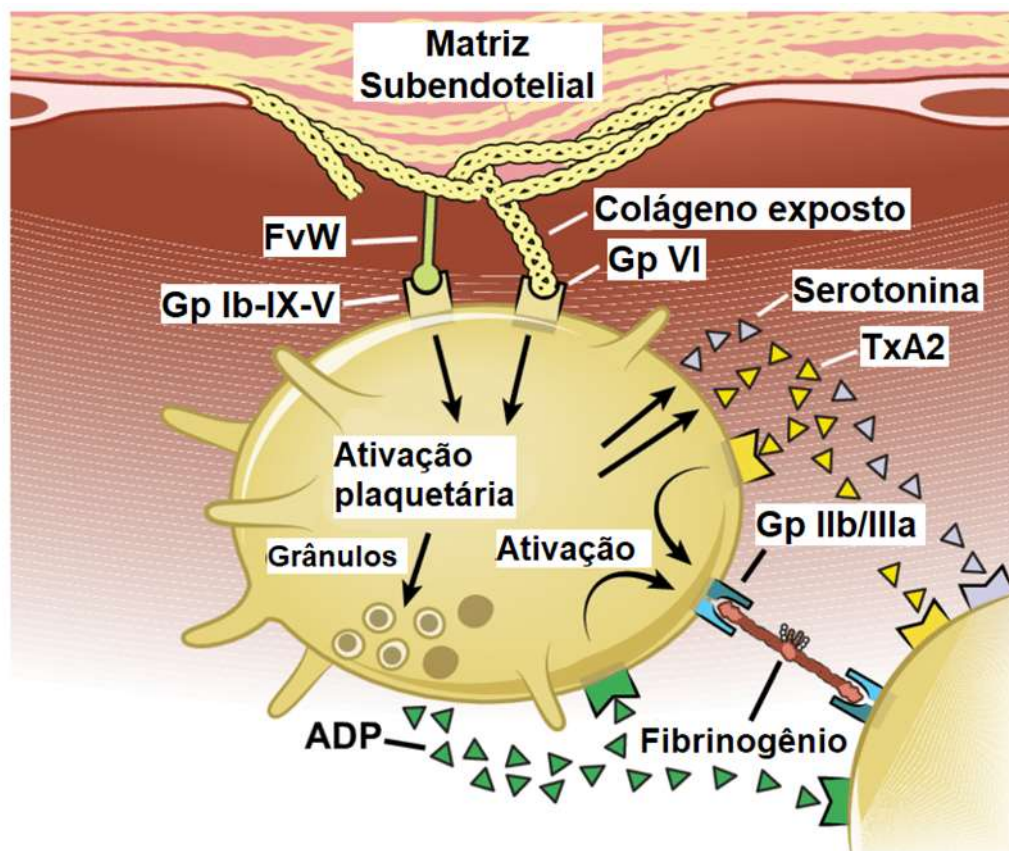
O sistema circulatório é coberto por uma camada de células longas e planas intituladas endotélio vascular. As células endoteliais encontram-se anatomicamente em uma região que permite sua interação com o meio extra e intravascular. Suas principais funções são: i) controlar o estado fluido do sangue; ii) agir como um bloqueio seletivo entre as substâncias trombogênicas encontradas nas camadas mais profundas da parede vascular e o fluxo sanguíneo; iii) sintetizar e liberar substâncias atuantes na agregação plaquetária como o fator de von Willebrand (FvW) e o colágeno; iv) produzir inibidores da coagulação sanguínea como o sulfato de heparano; e v) sintetizar ativadores da fibrinólise como o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (tPA) (CAHILL; REDMOND, 2016; CRISWELL, 2018).

Quando os vasos sanguíneos estão íntegros, grande parcela das plaquetas não interage de forma expressiva com as células endoteliais. Isso deve-se ao fato que o endotélio sintetiza substâncias como o óxido nítrico, o sulfato de heparano e a prostaglandina I₂ (PGI₂), que mantém a permeabilidade vascular, tornam-no antitrombogênico (BROOS et al., 2011; CRISWELL, 2018). Quando a integridade do vaso é lesada, as substâncias trombogênicas encontradas na matriz intravascular, como o FvW e o colágeno, são expostas ao fluxo sanguíneo, tornando o ambiente pró-trombótico. Essa alteração de estado resulta em uma sequência de eventos que culmina na formação de um trombo plaquetário. Esses eventos podem ser divididos em: adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária (CRISWELL, 2018; POLL; PARKER, 2020).

3.2.3 Adesão plaquetária

A adesão plaquetária inicial ocorre após a ligação do domínio A1 do FvW com a parte Ib da glicoproteína GpIb/V/IX presente na membrana plaquetária (Figura 2). Essa interação é primordial para a formação do trombo plaquetário, uma vez que o complexo FvW-GpIb atua desacelerando as plaquetas, mantendo-as próximas ao subendotélio exposto e permitindo, dessa forma, a interação desse com outros receptores plaquetários como GpVI e a integrina $\alpha 2\beta 1$ (GpIa/IIa). O colágeno exposto pela lesão vascular se liga às plaquetas por meio de dois receptores específicos, o GpVI e a integrina $\alpha 2\beta 1$. A GpVI é um membro da família de imunoglobulinas que possui baixa afinidade pelo colágeno, assemelhando-se à GpIb, e é incapaz de mediar sozinha a adesão plaquetária. Por outro lado, a GpVI induz forte sinalização por meio de suas cadeias FcR γ , tornando-se imprescindível para uma agregação estável. Ao ligar-se com o colágeno, a integrina $\alpha 2\beta 1$ atua aprimorando a ligação colágeno-GpVI, o que acaba acarretando a ativação de outras glicoproteínas como a GpIIb/IIIa. A ativação de ambos receptores é sinérgica, ou seja, um amplia a atividade do outro, resultando em uma adesão plaquetária resistente junto ao colágeno (BROOS et al., 2011; BROOS et al., 2012; CLEMETSON; CLEMETSON, 2019; LI, 2019).

Figura 2- Interações da fase de adesão plaquetária



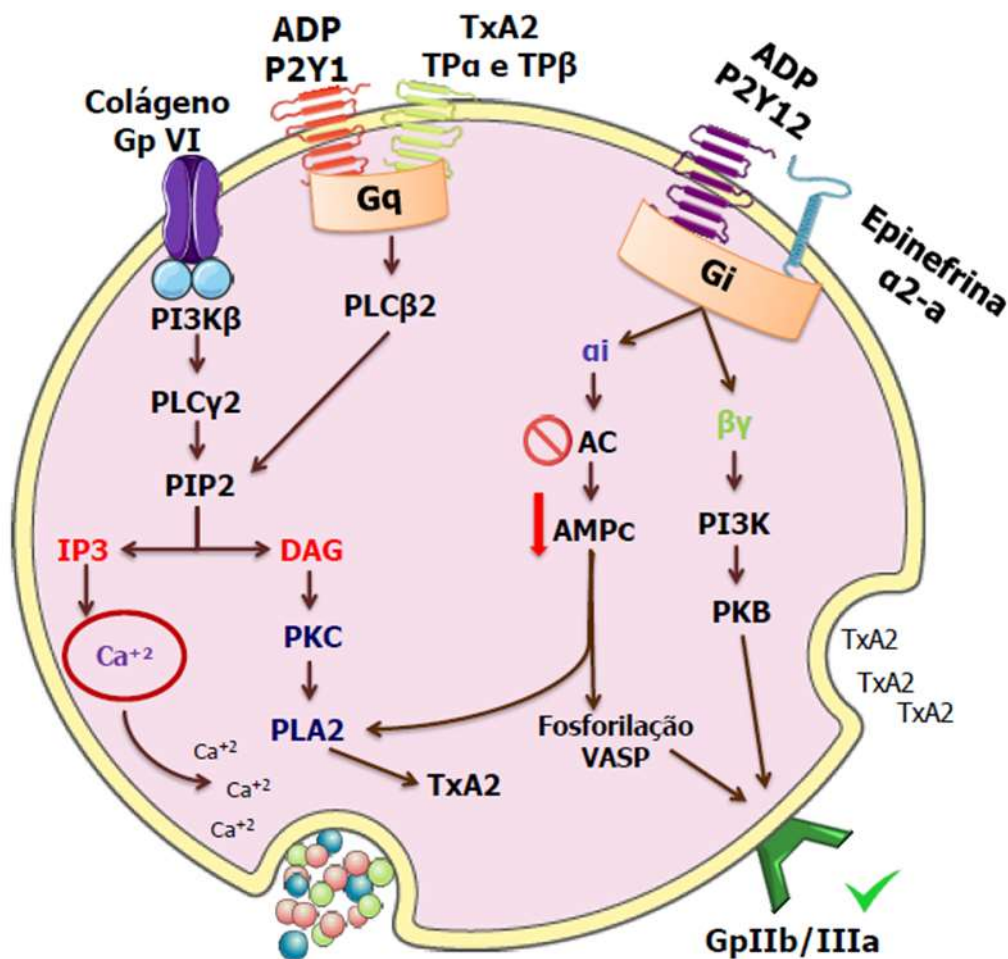
FvW - Fator de von Willebrand; Gp - Glicoproteína; TxA2 - Tromboxano A2. Fonte: adaptado de HALKAR; LINCOFF, 2016.

O processo de adesão culmina na formação de um aglomerado plaquetário ligado diretamente à região lesionada do vaso lesado, o que desencadeia o acionamento de inúmeras vias de ativação plaquetária (BROOS et al., 2011).

3.2.4 Ativação plaquetária

As plaquetas dispõem de inúmeras vias de ativação distintas, todas desencadeadas quando um agonista interage com seu receptor específico acoplado à membrana plaquetária (Figura 3) (POLL; PARKER, 2020). Os agonistas mais importantes para a ativação das plaquetas são o ADP, o colágeno, o tromboxano A2 (TxA2), a trombina e a epinefrina (TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017).

Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária



ADP - difosfato de adenosina; α_2 -a - α_2 -adrenérgicos; Gp - glicoproteína; PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase; PLC - fosfolipase C; PIP2 - fosfatidilinositol 4-bifosfato; DAG - diacilglicerol; IP3 - trifosfato de inositol; Ca^{+2} - cálcio; PKC - proteína quinase C; PLA2 - fosfolipase A2; TxA2 - tromboxano A2; AC - adenilato ciclase; AMPc - adenosina monofosfato cíclico; VASP - fosfoproteína estimulada por vasodilatador; PKB - proteína quinase B. Fonte: adaptado de BROOS et al., 2011.

De modo geral, acredita-se que a ativação plaquetária ocorra principalmente a partir do estímulo do receptor GpVI via ligação com o colágeno. Essa interação é mediada por tirosina-quinase que auxilia na liberação e ativação da fosfatidilinositol 3-quinase β (PI3K β), este, por sua vez, ativa a fosfolipase $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$). A PLC $\gamma 2$ hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) resultando na produção de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O IP3 atua em seu receptor no sistema tubular denso das plaquetas, promovendo a liberação de Ca^{+2} para o citoplasma. O aumento da concentração de cálcio citoplasmático é seguido por uma sequência de sinalizações celulares em cadeia, a qual produz diversas respostas que, agregadas, são

denominadas ativação plaquetária (BROOS et al., 2011; ALLFORD; MACHIN, 2004; CLEMETSON, 2012; VILAHUR et al., 2018). O DAG atua ativando a proteína quinase C (PKC), essa ativação resulta em uma gama de reações como ativação da fosfolipase A2 (PLA2), alteração no formato da plaqueta, secreção dos grânulos e geração de TxA2, culminando, assim, na agregação plaquetária também (BROOS et al., 2012; VILAHUR et al., 2018).

O ADP é um dos principais agonistas plaquetários. Ele é secretado pelos grânulos densos e estimula a ativação das plaquetas ao interagir com três diferentes receptores: P2X1, P2Y1 e P2Y12, sendo o primeiro ligado a canais iônicos e os últimos dois acoplados à proteína G (OURY et al., 2015; SON et al., 2017). O receptor P2X1 é encarregado de realizar o ágil influxo de Ca^{+2} extracelular e mudança conformacional das plaquetas, porém, como sua ação é transitória, o P2X1 por si só não é capaz de estabelecer um agregado plaquetário estável (CATTANEO, 2019a; CHANG et al., 2010; KOESSLER et al., 2018). O P2Y1 é um receptor acoplado à proteína Gq que, ao ser estimulado, ativa a PLC β 2 e esta, por sua vez, hidrolisa o PIP2, resultando na formação de IP3 e DAG que, conseqüentemente, desencadeará eventos de ativação plaquetária (ASLAM et al., 2013; CATTANEO, 2019a).

O receptor P2Y1 inicia a agregação das plaquetas, porém, a sinalização promovida por sua ativação não é o suficiente para a formação de um agregado estável, por essa razão, é fundamental a ligação do ADP ao receptor P2Y12, responsável pela estabilização da agregação (PFEFFERKORN et al., 2008; ZHAN et al., 2007). No momento em que o ADP entra em contato com receptor P2Y12 acoplado a proteína Gi, acontece o desbloqueio das subunidades contidas na proteína Gi: α_i e β_i . A fração α_i bloqueia a adenilato ciclase (AC), o que resulta na diminuição das concentrações citosólicas de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), reduzindo, dessa forma, a fosforilação da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) que é encarregada da ativação ou bloqueio do receptor GpIIb/IIIa. A fração β_i , por sua vez, ativa a PI3K que, juntamente com a estimulação de outras proteínas, também ativa a GpIIb/IIIa (ANGIOLILLO; FERREIRA, 2010; CATTANEO, 2019b; WALLER; SAMPSON, 2017).

A epinefrina é um agonista que se liga a receptores α_2 -adrenérgicos acoplados à proteína Gi. Como mencionado acima, os agonistas que interagem com a proteína Gi desencadeiam uma cascata de sinalização que culmina na diminuição de AMPC que, por

sua vez, atua aumentando a concentração de Ca^{+2} intracelular, estimulando, assim, a PLA2 (BROOS et al., 2012; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). A PLA2 atua hidrolisando fosfolipídeos de membrana da plaqueta como a fosfatidilcolina, que auxilia na liberação de AA (NAKAMURA et al., 1997; WOULFE, 2005). A enzima ciclooxigenase 1 (COX 1) fragmenta o AA dando origem a prostaglandinas. A enzima tromboxano sintetase atua sobre as prostaglandinas gerando o TxA2. O TxA2 é secretado pelas plaquetas ativadas e liga-se aos seus receptores ($\text{TP}\alpha$ e $\text{TP}\beta$) de superfície plaquetária. Esses receptores acoplados à proteína Gq ativarão as suas vias de sinalização, o que acarretará na secreção de grânulos, mudança conformacional e ativação da GpIIb/IIIa (BROOS et al., 2012; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017).

A trombina também é um mediador essencial para uma ativação persistente das plaquetas em reflexo ao dano tecidual. Ela é liberada pelos grânulos- α e interage com as plaquetas por meio dos seus dois receptores ativados por proteases (PAR-1 e PAR-4), ambos iniciadores de sinalização pela via da proteína Gq, que desencadeia a estimulação da $\text{PLC}\beta 2$ e, conseqüente, formação de TxA2 e ativação da GpIIb/IIIa. O receptor PAR-1 possui alta afinidade pela trombina, porém, sua ligação desencadeia agregações leves e passageiras, por outro lado, o PAR-4 é menos compatível com o agonista, mas sua ativação propicia a formação de trombos estáveis (CANDIA, 2012; CLEMETSON, 2012; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017; VILAHUR et al., 2018).

3.2.5 Secreção plaquetária

A ativação plaquetária está ligada a um grupo de modificações morfológicas e químicas que permitem às plaquetas alterações no citoesqueleto de actina, formação dos pseudópodes e, conseqüentemente, aumento na área superficial da plaqueta. O sistema contrátil actina-miosina é o responsável pela difusão granular sobre a lesão vascular. Para que ocorra o alastramento dos grânulos, é necessária a ativação das principais vias de sinalização plaquetária acima citadas (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016).

Os grânulos- α são os principais grânulos secretados pelas plaquetas, estima-se que em uma única plaqueta são encontrados aproximadamente 80 grânulos- α . A função deles provém do seu conteúdo, que é composto por proteínas também expressas na

superfície das plaquetas, como, GpIb/IX/V, GPVI, e GpIIb/IIIa, e por proteínas solúveis que são liberadas no espaço extracelular como os fatores de coagulação (I, V, IX e XIII) e FvW. Além das proteínas, outras substâncias são secretadas pelos grânulos- α como quimiocinas, moléculas de adesão (P-selectina) e componentes do sistema imune (imunoglobulina G) (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009; GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; KANNAN; AHMAD; SAXENA, 2019). A P-selectina (CD62P) é uma molécula de adesão celular que se apresenta na superfície externa da membrana após a interação entre plaquetas e células endoteliais, ou seja, posterior aos processos de adesão e ativação plaquetária. Por ser exposta somente quando ocorre a ativação das plaquetas, a CD62P é reconhecida como um biomarcador de ativação plaquetária (KAZIMIERCZYK et al., 2018; WYSOKINSKI et al., 2018).

Os grânulos densos possuem em sua composição grandes concentrações de componentes como ADP, trifosfato de adenosina (ATP), cátions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+), além de aminas bioativas como a serotonina e a histamina (FLAUMENHAFT, 2013). Esses pequenos constituintes liberados pelos grânulos densos, em conjunto com moléculas como o TxA₂, agem nas plaquetas circulantes estabelecendo um *feedback* positivo, resultando assim, na manutenção da agregação plaquetária (FLAUMENHAFT; SHARDA, 2019; GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; WAHED; QUESADA; DASGUPTA, 2020).

A degranulação dos lisossomos acontece de maneira mais lenta que os demais grânulos, demandando um agonista mais potente. Os lisossomos plaquetários apresentam enzimas responsáveis pela degradação de carboidratos, lipídios e proteínas, sendo as hidrolases ácidas as enzimas mais abundantes e necessárias para fragmentar e extinguir o agregado plaquetário. Por fim, os grânulos T atuam como um compartimento de posicionamento e sinalização do receptor 9 do tipo pedágio (TLR9) que, nas plaquetas, atua sobre o estresse oxidativo, a imunidade inata e a trombose (CRISWELL, 2018; FLAUMENHAFT, 2013).

3.2.6 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária é o resultado dos processos de adesão, ativação e secreção plaquetária que culminam na formação do trombo plaquetário a partir de interações mediadas pelo receptor GpIIb/IIIa. Após a ativação das plaquetas, ocorre a

conversão da forma inativa da GpIIb/IIIa para a ativa, o que permite sua ligação com várias substâncias extracelulares, principalmente o fibrinogênio, seu principal ligante. Essa interação com o fibrinogênio permite a ativação das plaquetas circulantes a partir das plaquetas já aderidas ao tampão, o que acaba por disseminar e estabilizar o trombo plaquetário (AUSTIN, 2017; JOBLING; EYRE, 2013; SIRA; EYRE, 2016).

3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

3.3.1 Cascata de coagulação sanguínea

O processo de coagulação sanguínea se resume em um complexo enzimático em que substratos inertes, comumente apresentados como fatores de coagulação (F) e nomeados por números romanos, são modificados e ativados. Esses fatores são serina-proteases que atuam em formato de cascata sequencial em que, um primeiro fator é ativado e este, por sua vez, aciona seu precursor inativo (zimogênio) e o ativa. O precursor recém-ativado dá sequência ao processo, acionando o zimogênio subsequente. Muitos dos eventos de ativação de fatores necessitam de colaboradores como os cofatores (fator V e VIII), o Ca^{+2} e os fosfolipídios, para que o processo ocorra de maneira eficaz. O desfecho da ativação em cascata dos fatores de coagulação dá-se com a formação de um coágulo estável e rico em fibrina. A regulação desse complexo é dependente de proteínas plasmáticas (anticoagulantes naturais) que controlam a atividade e produção desses vários fatores com a finalidade de prevenir possíveis trombos intravasculares indesejados. Tradicionalmente, a cascata de coagulação é dividida em via extrínseca e via intrínseca que terminam em uma via comum (CRISWELL, 2018; FREDENBURGH; WEITZ, 2018; SMITH; MORRISSEY, 2019; ZAIDI; GREEN, 2019).

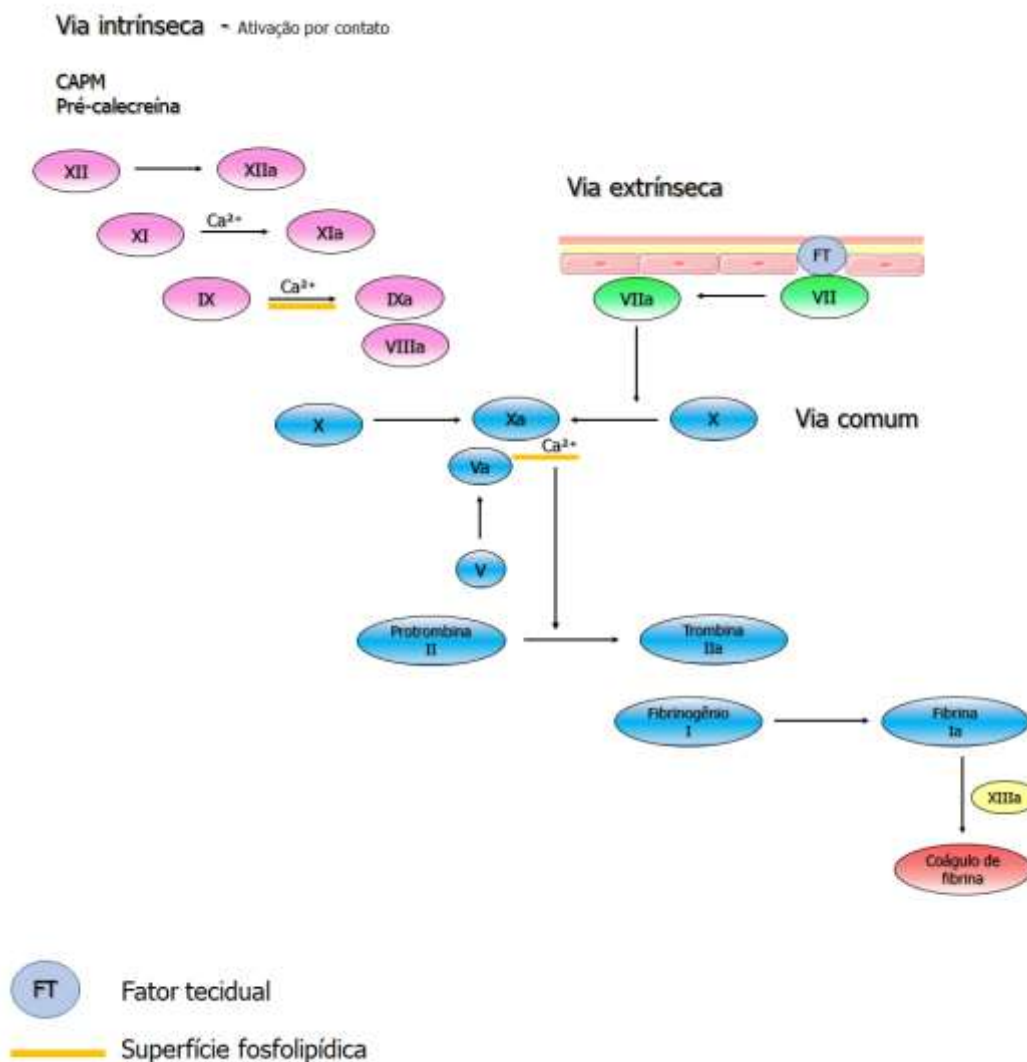
O início do processo de coagulação dá-se pela ativação da via extrínseca que, resumidamente, é a ligação do fator tecidual (FT) com o fator VII ativado (FVIIa). O FT é uma proteína de membrana integral que é encontrada em fibroblastos subendoteliais, células lisas e monócitos circulantes, sendo exposto principalmente quando ocorre uma lesão vascular. Em indivíduos saudáveis, o sangue comporta pequenas quantidades de FVIIa que, na inexistência de FT, possui atividade ínfima. Quando ocorre liberação de FT, o fator VII (FVII) e o FVIIa presentes na circulação ligam-se a ele, de modo

dependente de Ca^{2+} , formando o chamado complexo tenase extrínseco. Esse complexo FT/FVIIa é um catalisador da ativação do fator IX (FIX) da via intrínseca e do fator X (FX) da via comum. Quando ativados, o FIX e o FX atuam ativando FX e FII, respectivamente. Dessa forma, o complexo FT/FVIIa é apontado como peça primordial para o início da coagulação sanguínea (FREDENBURGH; WEITZ, 2018; KALATHOTTUKAREN; KIZHAKKEDATHU, 2018; YAN et al., 2018).

A via intrínseca envolve fatores existentes no plasma como pré-caliceína e o cininogênio. Ela não demanda uma superfície vascular para ser ativada e produzir fibrina. Essa via inicia-se quando o fator XII (FXII) é ativado (FXIIa) ao entrar em contato com superfícies de carga elétrica negativa como o colágeno. O FXIIa converte o fator XI (FXI) em XIa e este, por sua vez, também ativa o FIX. O FIXa então se une com o seu cofator, o fator VIIIa (FVIIIa) que é encontrado, principalmente, na superfície plaquetária. Essa junção FIXa/FVIIIa é denominada complexo tenase intrínseco que, com a influência de Ca^{2+} e de fosfolípídeos da membrana plaquetária, é encarregado de ativar o FX (ANNICHINO-BIZZACCHI; PAULA, 2018; OVERBEY; JONES; ROBINSON, 2014; SMITH; MORRISSEY, 2019; ZAIDI; GREEN, 2019).

A ativação do FX pelas vias intrínseca e extrínseca desencadeia a chamada via comum (Figura 4). O primeiro passo dessa fase consiste na ligação do FXa ao seu cofator proteico, o fator V ativado (FVa) que, na presença de Ca^{+2} e uma membrana fosfolipídica, forma o complexo protrombinase (FXa/FVa). Esse complexo é encarregado de fazer a conversão rápida de protrombina (FII) em trombina (FIIa). A trombina atua hidrolisando as ligações arginina-glicina do fibrinogênio liberando, dessa forma, monômeros insolúveis de fibrina (FIa). Por fim, a trombina ativa o fator XIII (FXIIIa) que atua na estabilização da fibrina e conseqüente formação do coágulo que irá selar o vaso e ainda preservar o tecido lesado até sua completa cicatrização (AUSTIN, 2017; NORRIS, 2003; OVERBEY; JONES; ROBINSON, 2014).

Figura 4 - Cascata da coagulação



Fonte: A autora.

O desenvolvimento dos coágulos de fibrina deve ocorrer de maneira regulada e limitada ao local da injúria vascular a fim de prevenir complicações trombóticas. As responsáveis por desencadear esse processo de regulação são as células endoteliais íntegras, que por meio de vários mecanismos ativam os anticoagulantes naturais que incluem: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a ativação da proteína C (PC) e da proteína S (PS), e a antitrombina (AT). Esses anticoagulantes atuam de forma sinérgica com o intuito de evitar a formação exacerbada de coágulos (FREDENBURGH; WEITZ, 2018; ZAIDI; GREEN, 2019).

O TFPI é conservado sobretudo nas plaquetas, porém, uma pequena quantidade também se encontra livre no plasma. O papel do TFPI é inibir os fatores Xa, VIIIa e tecidual, e, conseqüentemente, controlar a geração de trombina (ROGERS; NAKASHIMA; KOTTKE-MARCHANT, 2018; ZAIDI; GREEN, 2019). A regulação da trombina via PC ocorre quando a trombina se liga à trombomodulina, presente nas células endoteliais. Essa conexão da trombina acaba por estimular a ligação da PC com seu receptor e resulta em sua ativação. A PC ativada opera como um anticoagulante desativando e degradando os fatores V e VIII ativados, essenciais para a formação do coágulo. A PS atua como um cofator de intensificação da ação da PC (FREDENBURGH; WEITZ, 2018; LECOVER et al., 2019; ZAIDI; GREEN, 2019).

A AT é um inibidor de diversas enzimas ativadas da coagulação, sendo seus principais alvos os fatores Xa, IXa, o complexo FT/VIIIa e a trombina. Ao se ligarem com a AT, esses fatores formam complexos irreversíveis que acabam sendo neutralizados e eliminados. O sulfato de heparano, assim como a heparina utilizada farmacologicamente e os proteoglicanos, atua como coadjuvante acelerando a inibição dos fatores via AT (LECOVER et al., 2019; NORRIS, 2003).

3.3.2 Fibrinólise

Conforme o processo hemostático vai findando, é de suma importância a remoção do coágulo de fibrina para o retorno do equilíbrio e fluidez sanguínea. Esse processo envolve a ação de complexos enzimáticos que promovem a formação de plasmina, o agente degradante da fibrina (AUSTIN, 2017; NORRIS, 2003; SIRA; EYRE, 2016).

A fibrinólise se inicia no momento em que o dano vascular é detectado. As células endoteliais ao entrarem em contato com a trombina gerada pelo dano ou por outros agentes vasoativos, como a bradicinina, liberaram os dois principais ativadores fisiológicos de plasminogênio: o tPA e o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA). Esses ativadores clivam o plasminogênio quando ele se liga a aminoácidos da fibrina, originando, assim, a plasmina. A plasmina, por sua vez, age degradando o coágulo em partes denominadas produtos de degradação da fibrina (PDFs) (CHAPIN; HAJJAR, 2015; MERCER; CHAMBERS, 2013 SCHULMAN; FURIE, 2018; ZAIDI; GREEN, 2019).

Como qualquer outro processo fisiológico, a ativação da plasmina também precisa ser regulada para evitar eventuais efeitos indesejáveis. Os grandes responsáveis por essa inibição são: α -2 antiplasmina (α -2AP), a qual atua inibindo irreversivelmente a plasmina que sai do coágulo para a circulação; o inibidor de ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), que bloqueia a atividade do tPA e uPA; e por fim, o inibidor da fibrinólise ativado por trombina (TAFI), que digere os aminoácidos onde o plasminogênio se liga, eliminando, assim, o seu sítio de ligação (CHAPIN; HAJJAR, 2015; MUTCH, 2019; NORRIS, 2003; SCHULMAN; FURIE, 2018).

3.4 TROMBOSE

A trombose pode ser definida como um distúrbio patológico decorrente da ativação e disseminação inadequada dos processos hemostáticos naturais que abrange tanto o sistema venoso como o sistema arterial do organismo. Ela é de origem multifatorial e multigênica, ou seja, pode ser entendida como produto da influência ambiental aliada a carga genética de cada indivíduo (HOFFMAN, 2019; BHAGAVAN; HA, 2011).

Segundo dados divulgados pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (*International Society on Thrombosis And Haemostasis* – ISTH, 2020), uma em cada quatro pessoas no mundo com DCVs está morrendo devido às complicações de trombose. Nos Estados Unidos da América (EUA), a cada ano são notificados mais de 900.000 casos de pessoas com problemas relacionados a coágulos sanguíneos, destes, aproximadamente 100.000 irão a óbito, esse número ultrapassa as estatísticas de vítimas fatais devido a acidentes automobilísticos e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HUNT, 2020).

No Brasil, aproximadamente 300 mil pessoas morrem por ano em decorrência de DCV, o que corresponde a uma morte a cada 120 segundos. Qualquer faixa etária pode ser acometida, porém, pessoas entre 30 e 69 anos possuem aproximadamente 18% mais chances de óbito por causas cardiovasculares. Em 2018, foram contabilizados 256.389 óbitos por DCV na região sul a partir dos dados do Sistema Único de Saúde (SUS) (OLIVEIRA et al., 2020). Esse registro evidencia o impacto econômico relacionado com gastos nas esferas de atenção básica, medicamentos, internações e atendimentos de alta complexidade relacionados às DCV, visto que, na maioria das vezes, as DCV

evoluem para complicações secundárias, agravando o quadro inicial de cada indivíduo. Todas essas estatísticas colocam o Brasil entre os 10 países com maior incidência de mortes por doenças do aparelho circulatório (BHAGAVAN; HA, 2011; BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018; OLIVEIRA et al., 2020; SEPÚLVEDA; PALOMO; FUENTES, 2015).

Didaticamente, a trombose pode ser classificada em duas categorias prevalentes, trombose arterial e trombose venosa, ambas são responsáveis pelo surgimento de doenças subjacentes. A trombose arterial é desencadeada pela formação de agregados plaquetários em locais de grande fluxo sanguíneo e altas taxas de cisalhamento, sendo responsável pelo desenvolvimento de DCV como o IAM e o acidente vascular cerebral (AVC). Grande parte dos trombos arteriais ocorrem devido ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas que, quando rompem, expõem as substâncias trombogênicas presentes na matriz subendotelial, resultando na ativação de plaquetas e, conseqüentemente, na geração de trombina. Outros fatores são predisponentes à trombose arterial, como o tabagismo, o diabetes e a hipertensão arterial (FREDENBURGH; WEITZ, 2018; HOFFMAN, 2019; STAVROU; SCHMAIER, 2014).

Coágulos venosos surgem em locais de baixo fluxo sanguíneo e, geralmente, são os desencadeadores da trombose venosa, principal agente causador de EP e de TVP. Diferentemente dos coágulos arteriais, os coágulos venosos são compostos principalmente por hemácias e fibrina, contendo ainda uma pequena porção de plaquetas. Seu principal mecanismo de formação está intimamente ligado com um descontrole na cascata de coagulação e a conseqüente formação de trombina. Estima-se que, nos EUA, por ano, mais de 300.000 pessoas morrem por distúrbios venosos e, dentre os principais fatores de risco associados, se incluem malignidades, traumas, cirurgias e repouso prolongado (FREDENBURGH; WEITZ, 2018; HOFFMAN, 2019; MYERS et al., 2020; STAVROU; SCHMAIER, 2014).

3.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA TROMBOSE

Antiagregantes e anticoagulantes são essenciais na terapêutica medicamentosa atual das DCV, uma vez que diminuem o risco de trombose e previnem doenças desencadeadas pelo desequilíbrio hemostático (LORGA FILHO et al., 2013).

Uma das classes de antiagregantes mais utilizados na terapia é a dos inibidores da ciclooxigenase (COX) representados pelo ácido acetilsalicílico (AAS). O mecanismo de ação do AAS consiste em inibir irreversivelmente a COX-1 por meio de uma acetilação da hidroxila do resíduo de serina (Ser 530) no sítio ativo da enzima. A COX-1 é a responsável pela síntese de TxA₂, um importante agonista plaquetário. Como as plaquetas são células anucleadas, não podem sintetizar novas moléculas de COX-1 para substituir aquelas que foram acetiladas, conseqüentemente, sua capacidade de agregação será reduzida ao longo de sua vida útil. Suas principais indicações são para prevenção primária e secundária de AVC e IAM, este último, com uma redução de 22% dos casos após uso. Baixas doses são suficientes para um efeito antiagregante e seu principal efeito adverso é o sangramento, principalmente no sistema gastrointestinal (DORNBOS; NIMJEE, 2018; KUNADIAN et al., 2013; PATRONO, 2019; WALLER; SAMPSON, 2018).

Os antagonistas do receptor de ADP também são bastante utilizados na terapêutica antiplaquetária. Eles pertencem à classe das tienopiridinas e são divididos em duas gerações. Esses medicamentos possuem como mecanismo de ação a ligação seletiva e irreversível aos receptores P2Y₁₂. O receptor P2Y₁ não é afetado, com isso, a mudança conformacional da plaqueta não sofre nenhuma interferência. Dentre os de primeira geração, pode-se citar a ticlopidina, pró-fármaco que necessita de metabolização hepática *in vivo* para exercer os seus efeitos antiagregantes. Suas reações adversas incluem náuseas e vômitos, que acometem 50% dos pacientes, e a reação mais grave consiste na supressão da medula óssea que pode ser revertida com a interrupção da medicação. Devido a essas adversidades, a ticlopidina praticamente caiu em desuso (CATTANEO, 2019b; KUNADIAN et al., 2013; VON KÜGELGEN, 2019; WALLER; SAMPSON, 2018).

A segunda geração das tienopiridinas é principalmente representada pelo clopidogrel, outro pró-fármaco que necessita de metabolização hepática. Via de regra, o clopidogrel é mais seguro e aceito em relação ao seu similar de primeira geração, porém, um terço dos pacientes em terapia com esse medicamento é tido como não responsivo, obtendo pouco ou nenhum efeito antiagregante. Sugere-se que uma mutação no citocromo P-450 é a responsável pela não conversão do pró-fármaco e por sua baixa efetividade (CATTANEO, 2019b; DORNBOS; NIMJEE, 2018; GASECKA et al., 2019; VON KÜGELGEN, 2019; WALLER; SAMPSON, 2018).

Ainda dentro da classe dos antagonistas do receptor P2Y₁₂, o ticagrelor é um potente antagonista de ação direta que age em um sítio de ligação distinto das tienopiridinas, o que acaba lhe conferindo reversão de efeito. Sua ação é rápida, atingindo o pico de inibição em aproximadamente duas horas. Um benefício do ticagrelor é que sua administração pelos pacientes não responsivos ao clopidogrel acarreta o efeito antiagregante desejado (CATTANEO, 2019b; GASECKA et al., 2019).

Os antiagregantes englobam ainda a classe dos antagonistas do receptor GpIIb/IIIa, tendo o abciximabe, a eptifibatida e o tirofiban como representantes. O abciximabe é um anticorpo monoclonal que se liga irreversivelmente à GpIIb/IIIa inibindo, assim, a ligação desta com o fibrinogênio. Uma vantagem do uso desse fármaco, quando comparado com os outros da mesma classe, é que sua depuração não é renal, desse modo, torna-se uma alternativa para portadores de insuficiência renal, por outro lado, a gama de efeitos adversos (hipotensão, trombocitopenia - 2,9% - e vômitos), bem como a acessibilidade, uma vez que, anticorpos monoclonais possuem um elevado custo e a via de administração é intravenosa, tornam seu uso oneroso e restrito a hospitais. A eptifibatida é um peptídeo sintético que se liga de maneira reversível e competitiva ao receptor GpIIb/IIIa, diferentemente do abciximabe, sua depuração acontece pela via renal e, por essa razão, é contraindicado em pacientes com distúrbios renais. O seu principal efeito adverso é sangramento espontâneo. Por fim, o tirofiban é um não peptídeo sintético de ação não competitiva que possui atuação idêntica à eptifibatida, inclusive compartilhando a mesma via de excreção, suas reações adversas mais comuns são trombocitopenia (2,0%) e pequenos sangramentos, principalmente em idosos de baixa massa corporal (WALLER; SAMPSON, 2018; CALDEIRA; PEREIRA, 2019; MAHTTA; BAVRY, 2019).

Na terapia anticoagulante, uma das classes de maior relevância é a família das heparinas. As heparinas são glicosaminoglicanos sulfatados que se ligam à AT potencializando a ação anticoagulante desta. A heparina não fracionada (HNF) é obtida de fontes animais, particularmente em intestino de suínos, sua administração geralmente ocorre por via intravenosa, pois é pouco absorvida em superfícies mucosas. Apesar de serem muito utilizadas, constantes monitorizações laboratoriais e risco de contaminação por patógenos, pelo fato de ser uma substância biológica, inviabilizam sua ampla utilização na terapêutica. Além disso, seus efeitos adversos englobam hemorragias (5% graves, destas 0,05% fatais), trombocitopenia e, em alguns casos, reações anafiláticas e

osteoporose (BARDDAL et al., 2020; ROYSTON, 2019; GREEN, 2020; WALLER; SAMPSON, 2018). Heparinas de baixo peso molecular (HBPM) são subfrações das HNF produzidas por meio de uma despolimerização. Essa despolimerização confere vantagens clínicas às HBPM em relação ao seu precursor, sua via de administração é a subcutânea e possui atividade mais seletiva contra o FXa. Contudo, assim como os demais agentes antitrombóticos, seu principal efeito adverso é a hemorragia (HAO et al., 2019; ROYSTON, 2019; WALLER; SAMPSON, 2018).

Os anticoagulantes de via oral mais prescritos na clínica são os antagonistas da vitamina K como a varfarina, cujo mecanismo de ação consiste em inibir a síntese de proteínas dependentes da vitamina K, especialmente os fatores II, VII, IX e FX de coagulação e as proteínas C e S. Os efeitos adversos, juntamente com as características farmacológicas dessa classe, tornam o seu uso complexo; interações farmacológicas e alimentares, janela terapêutica estreita e necessidade de monitoramento frequente são alguns exemplos de desafios para seu uso universal (DOBESH; STACY, 2019; ROYSTON, 2019; THOMAS et al., 2020).

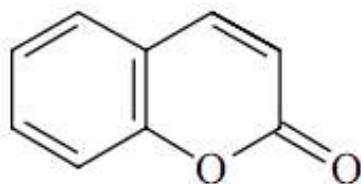
No decorrer da última década, ocorreu a introdução dos anticoagulantes orais de ação direta (DOACs) no mercado; seu desenvolvimento foi baseado na busca por uma alternativa ao tratamento medicamentoso convencional da TVP. O mecanismo de ação é direto e seletivo, consistindo na inibição de fatores de coagulação como o FXa (rivaroxabana e apixabana) ou do FIIa (dabigatrana) (BEKELIS et al., 2018; GUIMARÃES; GONÇALVES; MANSILHA, 2017). Desde o lançamento, essa classe vem sendo muito utilizada devido a seus benefícios como ampla janela terapêutica, o que permite a administração de doses fixas, existência de poucas interações medicamentosas, a não necessidade de monitoramento e o risco diminuído de complicações hemorrágicas, como, por exemplo, a hemorragia intracraniana. Por outro lado, a falta de antídotos, a meia-vida baixa (comprometimento da eficácia em caso de ingestão irregular do fármaco) e o valor de mercado são algumas das limitações dessa família de fármacos (BEKELIS et al., 2018; GUIMARÃES; GONÇALVES; MANSILHA, 2017; YOSHIDA, 2016).

Além dos efeitos adversos acima citados, pacientes em tratamento com anticoagulantes ou antiagregantes podem desenvolver resistência aos fármacos, resultando assim, em um aumento exponencial da dose terapêutica. Diante desse cenário, e com a dificuldade em se encontrar novos compostos com potencial biológico

voltado para a hemostasia, é de suma importância a busca por moléculas naturais ou sintéticas que possam inclusive melhorar e facilitar a adesão medicamentosa dos indivíduos que fazem o uso de terapia antitrombótica (CAI et al., 2016; FERNANDES et al., 2016).

3.6 CUMARINAS

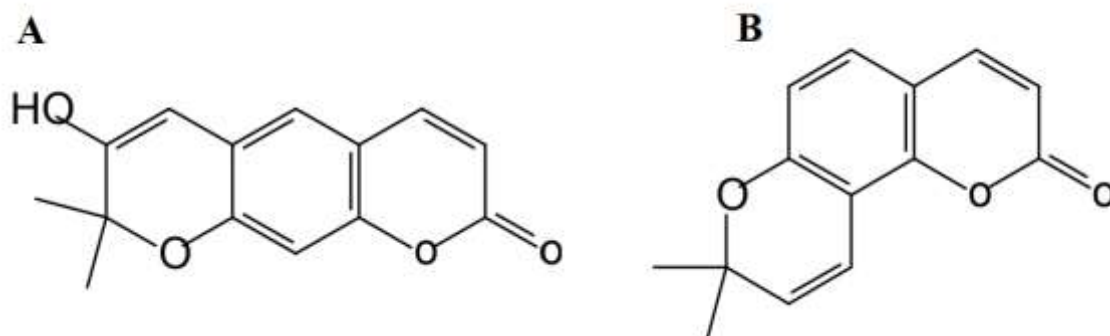
Cumarinas são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de seres vivos como plantas e fungos, sendo uma das classes terapêuticas de maior valia dentre os compostos naturais devido a sua complexidade e diversidade estrutural. Elas são formadas basicamente por compostos heterocíclicos de oxigênio, ou seja, um anel benzeno fundido com uma lactona, e possuem como matriz molecular a 1,2-benzopirona que, dentre todas as estruturas, é a mais simples (Figura 5). Desde a sua descoberta, essa classe vem sendo utilizada nos mais diversos setores industriais, incluindo a indústria farmacêutica. No presente, diversos medicamentos derivados de compostos cumarínicos são encontrados no mercado, sendo que o mais conhecido e utilizado é a varfarina. Devido à quantidade de compostos que podem proceder desse grupo, as cumarinas continuam sendo objeto de estudos farmacológicos como antivirais (MISHRA; PANDEY; MANVATI, 2020), antibacterianos, anticancerígenos (SANDHU et al., 2014) e anticoagulantes (REVANKAR et al., 2017), entre outros. Todos esses estudos só são possíveis pela facilidade de manusear e modificar os substituintes de cada molécula, sendo assim, as cumarinas podem ser vistas como estruturas privilegiadas, uma vez que sua síntese, *designer* e biodisponibilidade são alterados de acordo com o alvo terapêutico que se pretende atingir (KOSTOVA, 2006; SOUZA; RENNÓ; FIGUEROA-VILLAR, 2016).

Figura 5 - Estrutura química geral das cumarinas

Fonte: A autora.

3.7 PIRANOCUMARINAS

As piranocumarinas são um subgrupo das cumarinas que compreende um anel pirano com seis membros condensado ao núcleo cumarínico, além disso, elas são divididas em piranocumarinas lineares e angulares (Figura 6). Assim como as demais cumarinas, as piranocumarinas e seus derivados são alvos de estudos farmacológicos entre eles: hepatoprotetor (XIA et al., 2016), hiperglicemiante (KUMAR et al., 2009), antilipêmico (KUMAR et al., 2009), citotóxico (MARTIN et al., 2018), além de antiparasitário (MARTIN et al., 2018) e antifúngico (MONTAGNER, 2007; VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013).

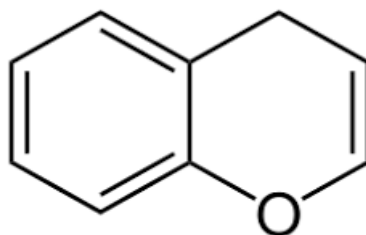
Figura 6 - Estrutura química geral das piranocumarinas

Painel A: Piranocumarina linear; Painel B: Piranocumarina angular. Fonte: A autora.

3.8 CROMENOS

Cromenos são compostos naturais encontrados principalmente nas plantas, sua estrutura consiste em um anel benzeno fundido com um anel pirano que também formam um sistema heterocíclico oxigenado (Figura 7). Essa conformação equivale ao complexo básico de vários polifenóis, flavonoides, alcaloides naturais e antocianinas. Estudos utilizando moléculas de cromenos concluíram que essa classe desempenha importantes funções biológicas como antitumorais (DASH et al., 2019), antioxidante (WANG; YANG; LI, 2006), analgésica e anticonvulsivante (THOMAS; ZACHARIAH, 2013). Como são compostos abundantes, de baixa toxicidade, derivados de heterocíclicos oxigenados e de natureza lipofílica, esta última conferindo aptidão para atravessar membranas celulares, os cromenos se tornam de grande valia para a busca de protótipos com ação farmacológica (COSTA et al., 2016; DINPARAST et al., 2020).

Figura 7 - Estrutura química geral dos cromenos



Fonte: A autora.

3.9 COMPOSTOS SINTÉTICOS

Por décadas, grande parte dos medicamentos disponíveis para fins terapêuticos provinham de produtos naturais ou então de análogos inspirados em sua estrutura. Como muitas vezes possuem uma disponibilidade finita e complexidade estrutural elevada, o que dificulta sua replicação em laboratório, a maioria dos compostos de origem natural é isolada em pequenas quantidades, fato esse que inviabiliza o seu uso em larga escala (CALIXTO, 2003; SANGI, 2016).

Os avanços científicos no campo da identificação de funções biológicas, marcadores e outras estruturas, possibilitaram um progresso significativo na síntese de

novos compostos puramente sintéticos, uma vez que, conhecendo a molécula biológica a atingir, é possível desenvolver uma substância ou um grupo delas que possuam seu mecanismo de ação voltado ao alvo terapêutico específico. Quando a busca por potenciais substâncias bioativas não possui um marcador biológico em questão, os compostos sintéticos são uma possibilidade interessante, visto que séries inteiras podem ser desenvolvidas com pequenas diferenças estruturais, aumentando, dessa forma, a abrangência de alvos moleculares e sítios de ação ainda inexplorados, propiciando, assim, analisar possíveis protótipos farmacológicos com mecanismos de ação distintos (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003; SANGI, 2016).

A síntese orgânica utilizada para o descobrimento de novos protótipos farmacológicos ganhou grande notoriedade nas últimas décadas, uma vez que sintetizar compostos proporciona a construção desde estruturas pequenas e simples, até moléculas com alto grau de complexidade, tudo dentro dos padrões necessários para uma futura utilização em estudos clínicos. Além disso, a síntese molecular permite a substituição ou até mesmo a adição de funções químicas a fim de potencializar e manter o efeito farmacológico, ou então, tornar a molécula menos nociva. Outra vantagem da construção molecular é a possibilidade de se obter um conjunto numeroso de análogos, sendo que, do ponto de vista medicinal, essa é uma grande vantagem, pois permite apurar quantitativa e qualitativamente as relações estrutura-atividade. Por fim, compostos sintéticos apresentam um elevado grau de pureza, que é essencial para a qualidade e confiabilidade do efeito farmacológico da molécula (BADE; CHAN; REYNISSON, 2010; ROSA; SCHENKEL; BERNARDES, 2020; SILVA, 2012; ULRICH-MERZENICH, 2014).

No mercado farmacêutico mundial, fármacos obtidos por síntese correspondem a 60% dos produtos prescritos e comercializados, sendo que no Brasil, essa projeção rende aproximadamente 160 milhões de dólares por ano, demonstrando assim, a importância da síntese de novos fármacos (SILVA, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob número 12353019.0.0000.0121 (Anexo A).

4.2 PARTICIPANTES E COLETA DE AMOSTRAS

Para a realização do estudo, amostras de sangue total foram coletadas de voluntários que realizaram exames no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – LAC/HU/UFSC/EBSERH. Os participantes incluídos no estudo não utilizaram antiagregantes, anticoagulantes ou anti-inflamatórios não esteroides nos 10 dias que antecederam a coleta, além disso, não possuíam histórico de doença hepática. Aos pacientes aptos a participar do estudo, foram esclarecidos a finalidade, os benefícios e a importância da pesquisa e, aqueles que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). De cada participante, foram coletados dois tubos de sangue contendo citrato de sódio 3,2% (9:1 v/v). Depois, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) da UFSC, onde foram processadas de acordo com a metodologia de cada experimento. Para cada experimento, amostras de no mínimo quatro pacientes foram utilizadas.

4.3 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS

Os compostos foram sintetizados na Central Analítica do bloco JK do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFSC pelo doutorando Erlon Ferreira Martin, do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC (PGFar/UFSC) sob orientação da Professora Dra. Maique Weber Biavatti e coorientação do Professor Dr. Louis Pergaud Sandjo do Laboratório de química de produtos naturais (MARTIN et al., 2018).

Resumidamente, para a síntese da molécula precursora (Figura 8, Painel D) de ambas as classes, utilizou-se um balão de fundo redondo onde foram adicionados

floroglucinol (15,8 mmol), 0,8 equivalentes de acetato de etila, sem a influência de solvente, o catalisador utilizado foi ácido polifosfórico 0,1 mol%. A mistura reacional foi mantida por 18 horas sob agitação magnética constante a uma temperatura de 60°C. O resultado da reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) (MARTIN et al., 2018).

Já para a síntese das piranocumarinas (Figura 8, Painel A, B e C), foi usado um sistema adaptado com refluxo e agitação constante. Sucintamente, também em um balão de fundo redondo contendo 10 mL de MeOH (metanol) foram adicionados malononitrila (1 mmol) ou cianoacetato de metila (1 mmol), juntamente com 1,0 equivalente de benzaldeído, em seguida, acrescentou-se 10 mol% do catalisador K_2CO_3 (carbonato de potássio) e, após um minuto, adicionou-se 1,0 equivalente do precursor. A reação também foi monitorada por CCD e o seu tempo de duração foi de até duas horas (MARTIN et al., 2018).

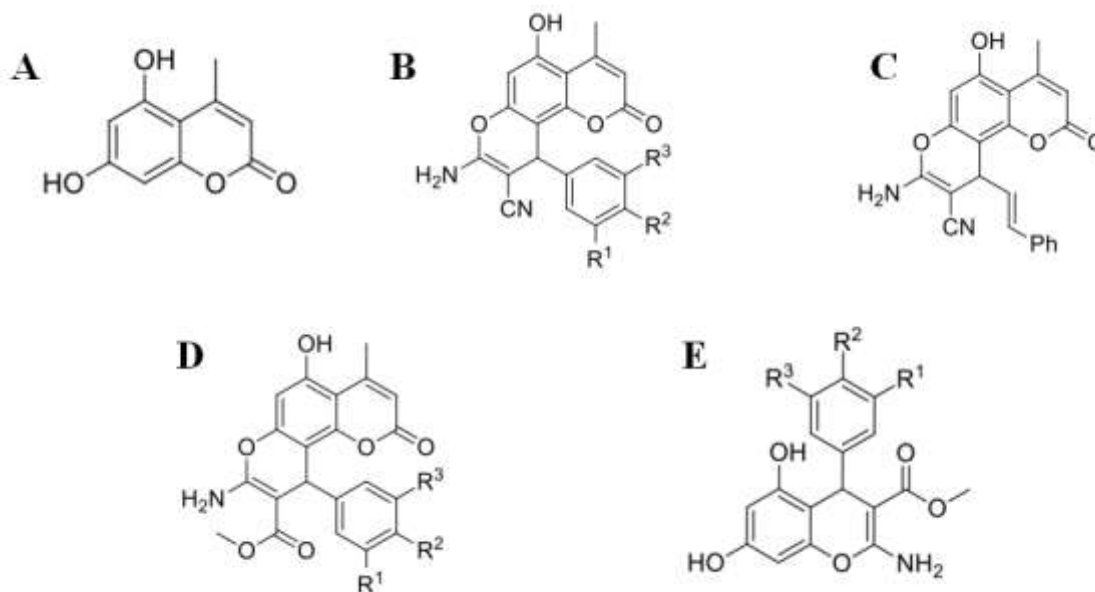
Por fim, para a síntese dos cromenos (Figura 8, Painel E), foi utilizado um sistema de agitação magnética sem aquecimento. Brevemente, em um balão de fundo redondo contendo 1,0 mL de MeOH foi solubilizado floroglucinol (1,0 mmol), 1,0 equivalente do benzaldeído e 1,0 equivalente do cianoacetato de metila. Posteriormente, 19 mL da solução aquosa de K_2CO_3 com concentração de 4,73 mg/mL foram inseridos. O tempo da reação foi de 18 horas e também foi monitorada por CCD, o produto final foi filtrado e lavado com água purificada (MARTIN et al., 2018).

Após serem gentilmente cedidos pelo doutorando e orientadores, a série de compostos sintéticos foi nomeada com a palavra “SEM” seguida de um número que representa a ordem de síntese (Figura 8 e Tabela 1). Ainda, o conjunto de compostos foi dividido entre os grupos fitoquímicos ao qual cada molécula pertence, são eles: cumarina precursora de ambas classes (SEM 19), piranocumarinas, representadas pelos compostos SEM 20, 21, 22, 23, 24, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 83 e 86; e cromenos, que correspondem aos compostos SEM 36, 37, 39, 40, 42, e 87.

Os compostos sintéticos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) para a obtenção de uma solução de uso (100 mM). Em seguida, as soluções foram armazenadas sob temperaturas baixas que variavam de 2-8 °C. Para a realização dos experimentos de triagem, utilizou-se a solução de uso pura em uma quantidade em que a concentração final do composto fosse de 500 μ M. Para os demais experimentos e concentrações, a solução de uso foi diluída em plasma pobre em

plaquetas (PPP) de forma que o volume a ser pipetado na amostra fosse sempre de 2 μ L. Independentemente do ensaio, sempre foi realizado um experimento controle em paralelo com o veículo de dissolução (DMSO 0,5% v/v concentração final) ao invés dos compostos sintéticos.

Figura 8 - Estrutura química básica das piranocumarinas e cromenos da série “SEM”



Painel A - Estrutura do composto precursor SEM 19; Painel B - Estrutura química básica das piranocumarinas SEM 20-24, 83 e 86; Painel C - Estrutura química básica da piranocoumarina SEM 27; Painel D - Estrutura química básica das piranocumarinas SEM 29-33; Painel E - Estrutura química básica dos cromenos SEM 36,37, 39, 40, 42 e 87. Fonte: A autora.

Tabela 1 - Substituintes químicos das piranocumarinas e cromenos da série “SEM”

Composto	R ¹	R ²	R ³
SEM 20	H	Cl	H
SEM 21	H	Br	H
SEM 22	H	NO ₂	H
SEM 23	MeO	MeO	H
SEM 24	MeO	MeO	MeO
SEM 29	H	Cl	H
SEM 30	H	Br	H
SEM 31	H	NO ₂	H
SEM 32	MeO	MeO	H
SEM 33	MeO	MeO	MeO

R¹ = radical 1; R² = radical 2; R³ = radical 3; H = hidrogênio; Cl = cloro; Br = bromo; F = flúor; NO₂ = dióxido de nitrogênio; MeO = metoxila; F = flúor. Fonte: A autora.

Tabela 1 – Substituintes químicos das piranocumarinas e cromenos da série “SEM” -
continuação

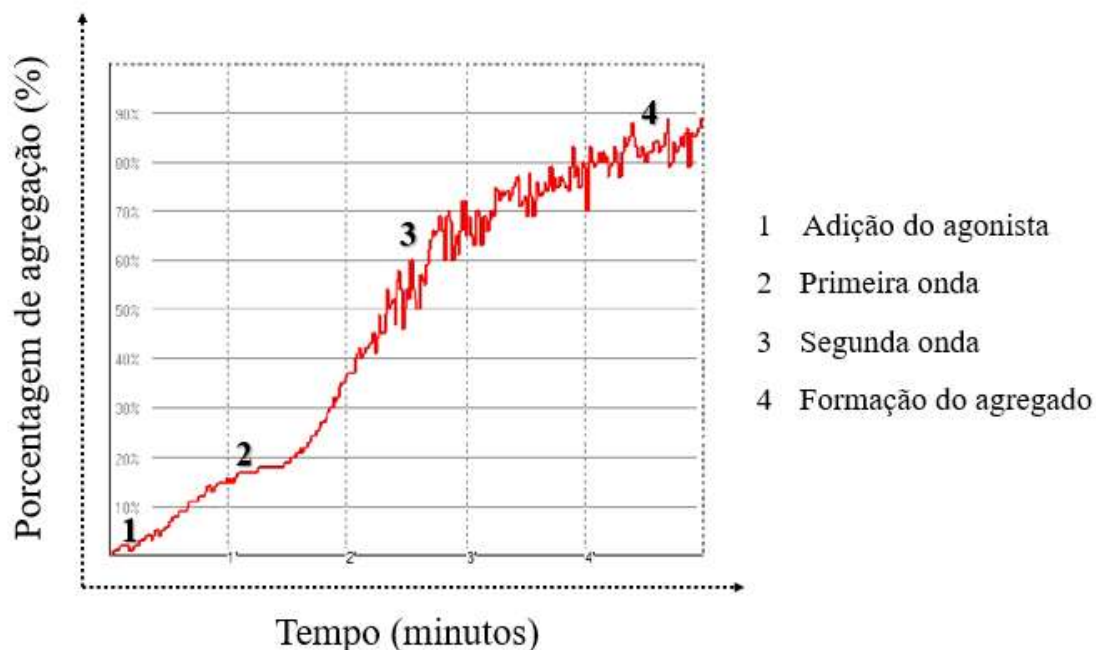
Composto	R¹	R²	R³
SEM 36	H	Br	H
SEM 37	H	NO ₂	H
SEM 39	MeO	MeO	H
SEM 40	MeO	OH	MeO
SEM 42	MeO	OH	H
SEM 83	H	F	H
SEM 86	H	Cl	H
SEM 87	H	F	H

R¹ = radical 1; R² = radical 2; R³ = radical 3; H = hidrogênio; Cl = cloro; Br = bromo; F = flúor; NO₂ = dióxido de nitrogênio; MeO = metoxila; F = flúor. Fonte: A autora.

4.4 ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados pelo método de turbidimetria descrito por Born e Cross (1963) por meio da utilização de um agregômetro de plaquetas semi automatizado (AgregGO, Qualitem). O teste de agregação por turbidimetria averigua alterações induzidas por agonistas, como o ADP e o colágeno, na densidade ótica de uma suspensão rica em plaquetas enquanto a amostra é agitada em um recipiente transparente a temperatura de 37°C (HAYWARD; MOFFAT, 2019). Conforme sucede a agregação das plaquetas, ocorre um aumento na transmissão de luz, resultado da diminuição da distribuição das plaquetas na suspensão, uma vez que estas estão formando aglomerados. Como resultado, o teste aponta uma relação entre o tempo e a densidade ótica podendo demonstrar fase de latência, alterações de forma e primeira e segunda onda de agregação como pode ser visto na Figura 9 (MILLER, 2019).

Figura 9 - Representação esquemática de uma curva de agregação plaquetária



Fonte: A autora.

Para a realização dos experimentos de agregação plaquetária, as amostras de sangue total coletadas foram centrifugadas em temperatura ambiente por 10 minutos a 123 g, os plasmas ricos em plaquetas (PRP) dos tubos centrifugados foram retirados e transferidos para um tubo tipo Falcon de 15 mL para obtenção de um *pool* de PRP. Seguindo, as plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e o *pool* de PRP foi ajustado com tampão fosfato-salino (PBS) de modo que a concentração correspondesse a 250.000 plaquetas/mm³. Para avaliar a agregação plaquetária frente aos compostos, 400 µL de PRP foram incubados com cada composto da série “SEM”, de ticlopidina 10 mM (controle positivo) ou de DMSO 0,5% v/v (controle negativo) por 5 minutos a 37°C. Subsequentemente, cada amostra foi estimulada por ADP (10 µM concentração final, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), epinefrina (5 µg/mL concentração final, Hipolabor, Minas Gerais, BR), colágeno (2 µg/mL; Chrono-Log Corp, Havertown, EUA) ou AA (500 µM; Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA). A porcentagem de agregação foi observada continuamente durante 5 minutos. Como linha de base para turbidez, foram empregadas amostras de PPP obtidas pela centrifugação de sangue total por 15 minutos em 1.107 g em temperatura de 8°C. Os ensaios foram executados em um período de no máximo três horas após a coleta, sendo efetuadas triplicatas. Os

resultados foram apresentados como porcentagem média de agregação e erro padrão da média.

4.5 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Os testes para a avaliação das vias da coagulação sanguínea foram realizados conforme Triplett, Harms e Koepke (1978), utilizando-se coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer) e reagentes TP Clot e TTPa Clot (BIOS Diagnóstica, São Paulo, Brasil). Primeiramente, as amostras de sangue venoso coletadas em tubo de citrato foram centrifugadas a temperatura de 8°C por 15 minutos a 1.107 g. Os PPPs obtidos pelo processo foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 15 mL, obtendo-se, assim, um *pool* de PPP. Como controle positivo para os testes, amostras de sangue total foram coletadas em tubo contendo heparina (17 IU/mL de sangue total) e processadas como mencionado acima. Para avaliação da via intrínseca da coagulação, empregou-se o teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em que 100 µL do *pool* de PPP mais 100 µL de reagente TTPa Clot foram incubados por 5 minutos a 37 °C com os compostos (500 µM concentração final) ou DMSO 0,5% v/v (controle negativo). Para o controle positivo do teste, 100 µL do *pool* de PPP coletado no tubo de heparina mais 100 µL de reagente TTPa Clot foram incubados por 5 minutos a 37°C. Após incubação, 100 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂) foram adicionados e, no exato momento, o cronômetro foi disparado para contagem do tempo de coagulação. O tempo de protrombina (TP) é responsável pela avaliação da via extrínseca. Nesse ensaio, 100 µL de PPP foram incubados com tempo, compostos e condições térmicas iguais ao citado para os testes de TTPa, da mesma forma para o controle positivo. Em seguida, 200 µL do reagente TP Clot foram adicionados e, novamente, o cronômetro foi imediatamente acionado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e obedecendo ao período de no máximo três horas após coleta das amostras.

Os resultados foram expressos como tempo médio em segundos para a formação do coágulo de fibrina e erro padrão da média. Dois parâmetros de padronização internacional também foram apresentados: a razão do TTPa, em quem os valores de referência variam entre 1,0 e 1,5; e a razão normalizada internacional (RNI) para o TP, em que os valores de referência variam entre 1,0 e 1,3. Ambos os valores de referência

são o esperado para indivíduos saudáveis ou que não fazem uso de anticoagulação (SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2019).

4.6 PREDIÇÃO TEÓRICA DE TOXICIDADE E BIODISPONIBILIDADE ORAL

A avaliação *in silico* da toxicidade de cada composto da série “SEM” foi realizada pelo programa *Osiris*[®] *Property Explorer* (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) em que alguns indicadores teóricos de toxicidade foram considerados, são eles: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução.

A biodisponibilidade oral dos compostos sintéticos foi analisada por intermédio do programa SwissADME, instrumento elaborado pelo Grupo de Modelagem Molecular do SIB (Instituto Suíço de Bioinformática), disponível em: <http://www.swissadme.ch/>. Lipinski (2001) e Veber (2002) propuseram que parâmetros físico-químicos eram os responsáveis pela disponibilidade oral de uma molécula, desse modo, o programa analisa esses parâmetros, que são constituídos por: número de ligações rotacionáveis, número de aceptores de ligação de hidrogênio (soma de N e O), número de doadores de ligação de hidrogênio (soma de OH e NH), área de superfície polar (TPSA), peso molecular (PM) e mLogP.

4.7 CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DOS COMPOSTOS

Após a triagem inicial de todos os compostos, foram selecionados para o prosseguimento dos estudos apenas três substâncias que obtiveram resultados satisfatórios em todos os testes aplicados. Os critérios utilizados para a escolha foram os seguintes: i) o efeito do composto inibir mais de 50% a agregação plaquetária; ii) composto não possuir predisposição *in vitro* a toxicidade; iii) apresentar biodisponibilidade oral dentro dos padrões propostos; iv) compilar os resultados anteriores com a observação da estrutura geral da substância.

4.8 VIABILIDADE PLAQUETÁRIA

A determinação da viabilidade celular é um dos critérios de maior relevância para a consolidação de uma nova molécula terapêutica. Nesta perspectiva, os compostos selecionados para o prosseguimento dos experimentos foram submetidos ao teste de exclusão por azul de *Trypan* a fim de avaliar a toxicidade dos mesmos em relação às plaquetas (STROBER, 2015).

Resumidamente, o teste de exclusão por corante é aplicado para indicar o número de células viáveis contidas em uma suspensão celular. Seu princípio é fundamentado no conceito de que células vivas possuem membranas íntegras que impedem a passagem do corante azul de *Trypan* para o interior celular, diferentemente das células mortas que acabam absorvendo a coloração (CHAN; RICE; QIU, 2020; STROBER, 2015).

Para a execução do teste, 400 μL do *pool* de PRP foram incubados durante 5 minutos com os compostos (500 μM concentração final) ou DMSO 0,5% v/v (controle positivo). O controle negativo foi preparado a partir dos reagentes *FIX & PERM* (Nordic MUBio®, Susteren, Nova Zelândia), em que 100 μL de PRP foram incubados por 15 minutos com 100 μL de FIX-A (fixador de células) a 37°C. Após o tempo, a suspensão foi lavada com 1 mL de PBS e centrifugada por 5 minutos a 264 g, seguindo, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 μL de FIX- B (permeabilizante) repetindo os processos de incubação, lavagem e centrifugação. Os reagentes do *FIX & PERM* garantem a conservação da morfologia das plaquetas bem como realizam a sua permeabilização, dessa forma, com a membrana rompida, o corante azul de *Trypan* consegue entrar facilmente no citoplasma plaquetário, simulando a coloração de células não viáveis.

As amostras de PRP tratadas foram transferidas para um *ependorf* contendo igual volume azul de *Trypan* (0,4%). Posteriormente, a câmara de Neubauer foi preenchida com uma alíquota da misturada e deixada em repouso em câmara úmida por 5 minutos. Após, observou-se em microscópio com objetiva de 40x e as plaquetas viáveis e não viáveis foram contadas separadamente. O percentual de plaquetas viáveis foi calculado conforme a Equação 1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados por dois pesquisadores. Os resultados foram apresentados como porcentagem média de agregação e erro padrão da média.

Equação 1 -Cálculo da viabilidade plaquetária

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

4.9 DETERMINAÇÃO DO EFEITO CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (CI₅₀)

A determinação da CI₅₀ foi realizada apenas para os compostos que obtiveram os melhores desempenhos nos experimentos de triagem e nas avaliações *in silico*. Para determinar a CI₅₀, o PRP foi tratado com DMSO 0,5% v/v (controle negativo) ou com os compostos selecionados em diversas concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,2 e 15,6 µM) preparadas por meio de diluições seriadas em PPP. As amostras tratadas foram incubadas por 5 minutos e, em seguida, realizou-se o teste de agregação plaquetária como detalhado no item 4.4 O cálculo da CI₅₀ foi realizado a partir da curva dose-resposta construída utilizando-se o software GraphPad Prism 5. Como para os demais ensaios, todos os experimentos foram realizados triplicata e no máximo em três horas após coleta das amostras.

4.10 DETERMINAÇÃO DO EFEITO TEMPO-RESPOSTA

Para determinar se o efeito dos três cromenos era dependente do tempo de incubação, ensaios adicionais de agregação plaquetária foram realizados. Para tal experimento, o PRP foi incubado com os compostos na sua concentração de CI₅₀ por 5 e 15 minutos, em seguida, as amostras tratadas foram estimuladas por ADP ou epinefrina conforme descrito no item 4.4 e a porcentagem de agregação foi computada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram apresentados como porcentagem média de agregação e erro padrão da média.

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

A resposta das plaquetas mediante diferentes agonistas pode ser comprovada pela utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra marcadores de ativação

plaquetária (VAN VELZEN et al., 2012). O padrão ouro para essa metodologia consiste na utilização do anticorpo anti-CD62P em conjunto com outros marcadores plaquetários específicos (NAGY; DEBRECENI; KAPPELMAYER, 2013). No presente estudo, a ação dos compostos selecionados sobre a ativação plaquetária foi avaliada pela determinação da expressão do receptor de GpIIb/IIIa ativado e da proteína adesiva P-selectina por citometria de fluxo. Para tal modelo experimental, foram utilizados os anticorpos PAC-1-FITC (clone PAC-1; BD Biosciences) e anti-CD62P-PE (clone AK-4; BD Biosciences) que avaliam a expressão de GpIIb/IIIa ativado e P-selectina, respectivamente.

Durante a ativação plaquetária, a GpIIb/IIIa, presente na membrana da plaqueta e secretada a partir dos grânulos- α , sofre uma mudança conformacional derivada da força de cisalhamento provinda da agregação das plaquetas e essa mudança resulta na ativação do receptor. O anticorpo do tipo PAC-1 é um marcador específico para o formato ativado da GpIIb/IIIa. A P-selectina (CD62P) é uma proteína também encontrada nos grânulos- α de plaquetas em repouso e esta se transloca para a superfície das plaquetas após a ativação plaquetária. Dessa forma, um anticorpo específico para P-selectina apenas interage com as plaquetas ativadas após a secreção do conteúdo do grânulo- α (LU; MALINAUSKAS, 2010; NAGY; DEBRECENI; KAPPELMAYER, 2013). Além disso, as amostras testadas foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD61-PerCP (clone PN IM 1758U; BD Biosciences). O CD61 é um marcador utilizado na identificação de plaquetas, tanto ativas como inativas (MOREL, et al., 2017).

Na Tabela 2 estão apresentados os tubos utilizados para os ensaios de citometria de fluxo e o que foi adicionado a cada um deles. Sucintamente, para a realização dos ensaios, 400 μ L de PRP foram incubados por 5 minutos com cada um dos compostos SEM 39, 40 e 42 na sua CI_{50} para epinefrina ou com o DMSO 0,5% (v/v) a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram estimuladas com 10 μ L de epinefrina (5 μ g/mL concentração final) e novamente incubadas por 5 minutos. Em tubos de ensaio (Tabela 2), uma alíquota (50 μ L) de cada PRP tratado e estimulado foi marcada e incubada por 15 minutos ao abrigo de luz com os anticorpos monoclonais PAC1-FITC (20 μ L), anti-CD62P-PE (5 μ L) e anti-CD61-PerCP (2 μ L). Após, as amostras foram lavadas com 2 mL de PBS seguido de centrifugação por 5 minutos a 277 g. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de plaquetas foram suspensos em 500 μ L de

PBS. Em seguida, as amostras foram adquiridas e analisadas pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II flow cytometer; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA). De maneira semelhante, o controle de autoativação plaquetária foi realizado em um tubo contendo PRP tratado com DMSO 0,5% (v/v) sem a estimulação do agonista e marcado com todos os anticorpos monoclonais.

Tabela 2 – Tubos de citometria de fluxo e os anticorpos utilizados.

Tubo	PRP	Anti-PAC1-FITC	Anti-CD62P-PE	Anti-CD61-PerCP
Branco	50 µL	-	-	-
Branco com composto	50 µL	-	-	-
Controle sem agonista	50 µL	20 µL	5 µL	2 µL
Controle com agonista	50 µL	20 µL	5 µL	2 µL
Teste (SEMs)	50 µL	20 µL	5 µL	2 µL

PRP – plasma rico em plaquetas. Fonte: A autora.

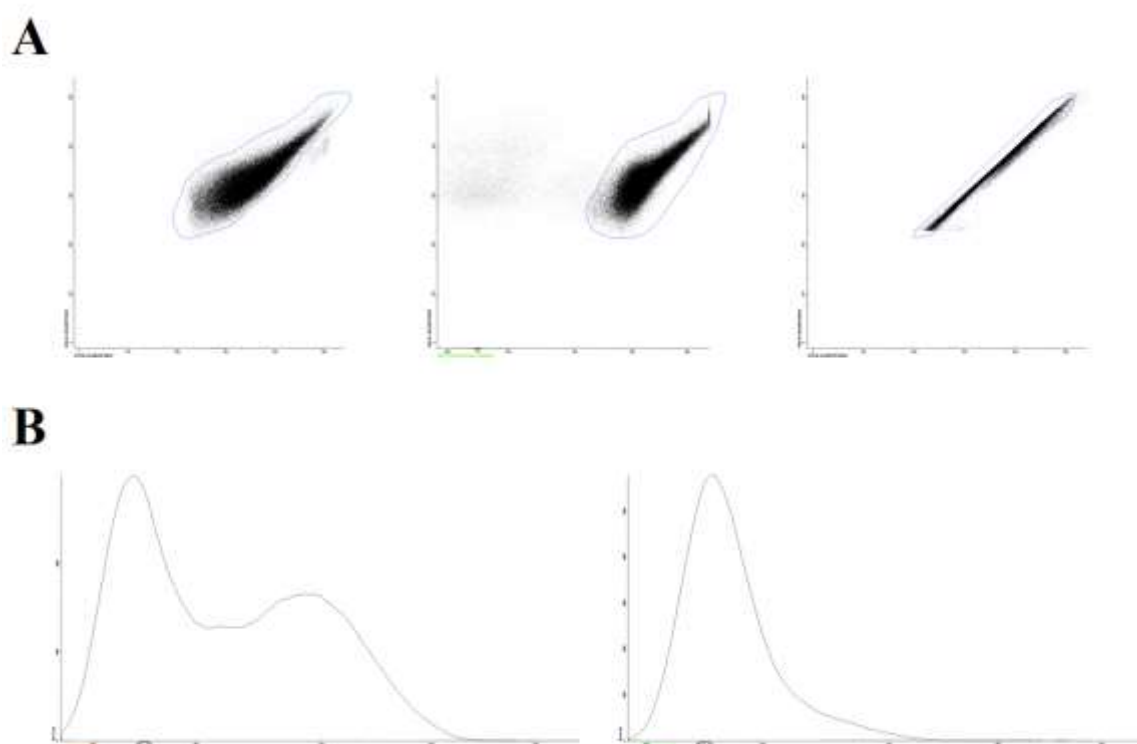
Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados no software Infinicyt (Cytognos®) versão 2.0. As plaquetas da amostra foram reconhecidas mediante suas características de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente), assim como por sua positividade para CD61 (Figura 10). Foram analisados 10.000 eventos positivos para CD61 em cada tubo do ensaio, elucidados na forma de histogramas e intensidade de fluorescência média (IFM). A IFM foi analisada, e os dados foram fundidos por uma ferramenta de associação de documentos (do inglês, *file merge*) do Infinicyt. Sucintamente, os arquivos de todos os dias de experimento foram fundidos em um único arquivo final que possibilita uma visão síncrona da população de plaquetas em relação a todos os marcadores fenotípicos contidos no painel de anticorpos. A partir das IFMs obtidas e da Equação 2, foram determinadas as porcentagens de inibição da expressão de PAC-1 e CD62P. Os ensaios do experimento em questão foram realizados em duplicata e no máximo em três horas após coleta das amostras.

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

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

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

Figura 10 - *Dot-plots* e histogramas representativos da análise da expressão do receptor GpIIb/IIIa ativado (PAC1) e de P-selectina (CD62P) por citometria de fluxo



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

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi efetuada com o auxílio do software MedCalc[®] v.20.008 e, para a construção gráfica, foi aplicado o software GraphPad Prism. De acordo com o número de grupos da variável qualitativa, as médias foram comparadas utilizando-se o

teste t de Student para amostras independentes ou ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ou Bonferoni. Foi adotado um nível de confiança de 5% ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 AÇÕES DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM” SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Para investigar a ação da série “SEM” sobre a agregação plaquetária, foi realizada uma triagem inicial utilizando-se o ADP e a epinefrina como agonistas. Os resultados da triagem estão apresentados na Tabela 2. Como é possível observar, todos os compostos inibiram significativamente a agregação plaquetária, independentemente do agonista utilizado. Quase todos os compostos apresentaram atividade promissora, uma vez que inibiram a agregação em mais de 50% nos dois estímulos testados.

Tabela 3 - Efeito dos compostos (500 μ M) da série “SEM” sobre a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP (10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL).

Tratamento		ADP Média \pm EP (%)	Epinefrina Média \pm EP (%)
	Controle negativo	88,7 \pm 0,8	83,5 \pm 0,8
	Controle positivo	3,0 \pm 2,8*	2,0 \pm 1,4*
Cumarina	SEM 19	50,8 \pm 4,5*	10,2 \pm 2,1*
Piranocumarinas	SEM 20	74,0 \pm 4,8*	4,3 \pm 0,9*
	SEM 21	14,7 \pm 2,2*	6,2 \pm 1,6*
	SEM 22	16,8 \pm 2,0*	5,2 \pm 1,3*
	SEM 23	32,4 \pm 3,4*	75,3 \pm 1,8*
	SEM 24	42,7 \pm 5,3*	55,0 \pm 2,0*
	SEM 27	74,7 \pm 2,6*	66,6 \pm 2,2*
	SEM 29	32,8 \pm 5,0*	9,0 \pm 1,6*
	SEM 30	36,8 \pm 4,4*	5,7 \pm 0,8*
	SEM 31	31,7 \pm 3,5*	14,0 \pm 2,5*
	SEM 32	8,8 \pm 1,1*	13,0 \pm 2,0*
	SEM 33	2,0 \pm 0,7*	5,3 \pm 1,3*
	SEM 83	23,5 \pm 4,3*	14,5 \pm 2,3*
SEM 86	16,0 \pm 5,4*	10,0 \pm 1,1*	

Controle negativo – DMSO 0,5% (v/v); Controle positivo – ticlopidina 10 mM; ADP - difosfato de adenosina; EPM– erro padrão da média. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão; N = 3. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao controle negativo (P \leq 0,05). Fonte: A autora.

Tabela 4 - Efeito dos compostos (500 μ M) da série “SEM” sobre a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP (10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL) - continuação.

Tratamento		ADP Média \pm EP (%)	Epinefrina Média \pm EP (%)
	Controle negativo	88,7 \pm 0,8	83,5 \pm 0,8
	Controle positivo	3,0 \pm 2,8*	2,0 \pm 1,4*
Cumarina	SEM 19	50,8 \pm 4,5*	10,2 \pm 2,1*
Cromenos	SEM 36	35,0 \pm 4,8*	26,2 \pm 1,4*
	SEM 37	32,8 \pm 2,7*	24,3 \pm 2,2*
	SEM 39	22,2 \pm 5,7*	11,5 \pm 2,3*
	SEM 40	1,5 \pm 0,8*	3,0 \pm 0,7*
	SEM 42	3,8 \pm 1,1*	8,0 \pm 1,7*
	SEM 87	6,0 \pm 1,2*	13,0 \pm 1,3*

Controle negativo – DMSO 0,5% (v/v); Controle positivo – ticlopidina 10 mM; ADP - difosfato de adenosina; EPM– erro padrão da média. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão; N = 3. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao controle negativo ($P \leq 0,05$). Fonte: A autora.

5.2 AÇÃO DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM” SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Além da atividade antiagregante, foi realizada uma triagem para investigar o efeito dos compostos de séria “SEM” sobre as vias extrínseca e intrínseca da coagulação utilizando-se o TP e o TTPa, respectivamente. Na Tabela 3 estão expressos os resultados desses ensaios, na qual é possível observar que as piranocumarinas não prolongaram significativamente o tempo em nenhum dos dois testes. No entanto, no grupo dos cromenos, o composto SEM 37 prolongou significativamente o TP, apresentando RNI muito próximo de 1,0. Com relação à ação sobre a via intrínseca, os compostos SEM 40 e 42 causaram prolongamentos significativos do TTPa, com razões idênticas de 1,3. A substância precursora (SEM 19) atuou sobre as duas vias da coagulação, apresentando um RNI de 1,04 e uma razão de TTPa de 1,06.

Tabela 3 - Efeito dos compostos (500 μ M) da série “SEM” sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

Tratamento		TP Média \pm EP (s)	TP _{RNI}	TTPa Média \pm EP (s)	TTPa _{razão}
	CN	15,7 \pm 0,1	-	26,3 \pm 0,3	-
	CP	>100	-	>100	-
Cumarina	SEM 19	16,7 \pm 0,1*	1,04	29,4 \pm 0,5*	1,06
Piranocumarinas	SEM 20	16,4 \pm 0,3	1,05	26,4 \pm 0,4	0,99
	SEM 21	16,2 \pm 0,2	1,05	27,0 \pm 0,6	1,01
	SEM 22	15,7 \pm 0,1	1,00	27,0 \pm 0,5	1,02
	SEM 23	15,5 \pm 0,2	1,01	27,3 \pm 0,2	1,03
	SEM 24	15,7 \pm 0,2	1,01	26,1 \pm 0,1	1,00
	SEM 27	15,8 \pm 0,3	1,02	26,3 \pm 0,2	1,00
	SEM 29	15,5 \pm 0,1	1,00	25,8 \pm 0,3	0,96
	SEM 30	15,5 \pm 0,2	1,01	26,0 \pm 0,4	1,01
	SEM 31	15,7 \pm 0,2	0,99	26,1 \pm 0,4	1,02
	SEM 32	15,5 \pm 0,1	1,00	25,7 \pm 0,2	1,00
	SEM 33	16,2 \pm 0,3	1,07	25,0 \pm 0,1	0,98
	SEM 83	15,7 \pm 0,1	0,99	24,0 \pm 0,2	0,92
	SEM 86	15,7 \pm 0,3	0,98	25,5 \pm 0,3	1,02
Cromenos	SEM 36	16,1 \pm 0,2	1,01	25,6 \pm 0,2	1,00
	SEM 37	16,6 \pm 0,1*	1,07	26,1 \pm 0,1	1,02
	SEM 39	15,5 \pm 0,1	1,00	26,3 \pm 0,3	1,00
	SEM 40	15,9 \pm 0,2	1,02	33,7 \pm 0,1*	1,29
	SEM 42	16,0 \pm 0,2	1,01	34,0 \pm 0,5*	1,33
	SEM 87	16,1 \pm 0,1	1,00	26,0 \pm 0,7	1,03

CN (Controle negativo) – DMSO 0,5% (dimetilsulfóxido; v/v); CP (Controle positivo) - PPP coletado em tubo contendo heparina (17 IU/mL de sangue total); EP – erro padrão da média; RNI – razão normalizada internacional. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão; N = 3. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Fonte: A autora.

5.3 PREDIÇÃO TEÓRICA DE TOXICIDADE E BIODISPONIBILIDADE ORAL DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM”

Como vários compostos apresentaram significativa atividade antiagregante na triagem *in vitro*, realizou-se a análise dos parâmetros teóricos preditivos de toxicidade e de biodisponibilidade oral para auxiliar na seleção de quais compostos seriam mais promissores e, portanto, selecionados para dar continuidade aos estudos.

A avaliação teórica da toxicidade efetuada através do programa *Osiris*[®] *Property Explorer* indicou que todos os compostos do grupo das piranocumarinas (Tabela 4) apresentam baixo risco para os parâmetros de mutagenicidade e tumorigenicidade, por outro lado, essas substâncias apresentaram elevado risco de efeito irritativo e efeito negativo sobre a reprodução. Dentre os cromenos, todos apresentaram baixo risco para todos os parâmetros de toxicidade. A cumarina, substância precursora, demonstrou alto risco apenas para efeito negativo sobre a reprodução.

Tabela 4 - Predição teórica da toxicidade dos compostos da série “SEM” determinada com auxílio do programa *Osiris*[®] *Property Explorer*

Composto		Mutagenicidade	Tumorigenicidade	Efeito irritativo	Efeito negativo sobre a reprodução
Cumarina	SEM 19	1	1	1	3
	SEM 20	1	1	3	3
Piranocumarinas	SEM 21	1	1	3	3
	SEM 22	1	1	3	3
	SEM 23	1	1	3	3
	SEM 24	1	1	3	3
	SEM 27	1	1	3	3
	SEM 29	1	1	3	3
	SEM 30	1	1	3	3
	SEM 31	1	1	3	3

Os riscos foram classificados em: 1 = baixo risco teórico de toxicidade; 2 = médio risco teórico de toxicidade; 3= alto risco teórico de toxicidade. Fonte: A autora.

Tabela 4 - Predição teórica da toxicidade dos compostos da série “SEM” determinada com auxílio do programa *Osiris*[®] *Property Explorer* - continuação

Composto		Mutagenicidade	Tumorigenicidade	Efeito irritativo	Efeito negativo sobre a reprodução
Cumarina	SEM 19	1	1	1	3
Piranocumarinas	SEM 32	1	1	3	3
	SEM 33	1	1	3	3
	SEM 83	1	1	3	3
	SEM 86	1	1	3	3
Cromenos	SEM 36	1	1	1	1
	SEM 37	1	1	1	1
	SEM 39	1	1	1	1
	SEM 40	1	1	1	1
	SEM 42	1	1	1	1
	SEM 87	1	1	1	1

Os riscos foram classificados em: 1 = baixo risco teórico de toxicidade; 2 = médio risco teórico de toxicidade; 3= alto risco teórico de toxicidade. Fonte: A autora.

Os critérios físico-químicos das piranocumarinas e cromenos foram presumidos utilizando-se a ferramenta *in silico* SwissADME. Com a análise dos dados (Tabela 5), é possível observar que, no grupo piranocumarinas, apenas o SEM 22 violou uma das regras propostas por Lipinski (2001) e Veber (2002). Em relação aos cromenos, dois compostos violaram uma das regras, o SEM 37 e o SEM 40.

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos das piranocumarinas e cromenos da série “SEM” calculados pelo programa SwissADME

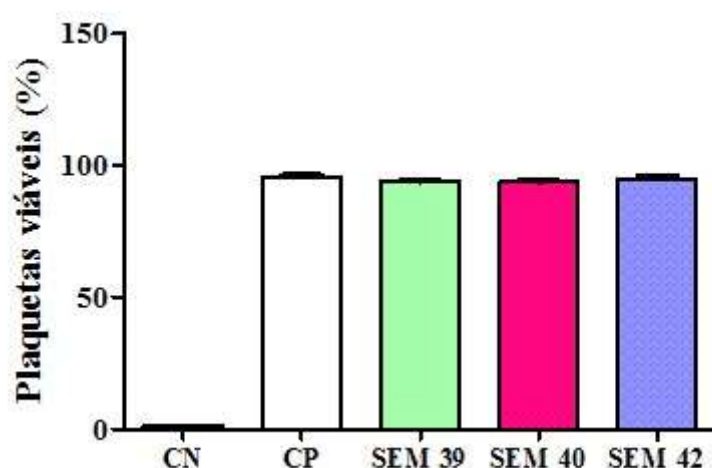
		PARÂMETROS						
		mLog P	PM	nO+N	nOH+NH	N rotb	TPSA	Nº violações
Regra		≤ 4,15	< 500	≤ 10	≤ 5	< 10	≤ 140	≤ 1
Cumarina	SEM 19	0,76	192,17	4	2	0	70,67	0
	SEM 20	2,19	380,78	5	2	1	109,48	0
Piranocumarinas	SEM 21	2,30	425,23	5	2	1	109,48	0
	SEM 22	0,82	391,33	7	2	2	155,3	1
	SEM 23	1,09	406,39	7	2	3	127,94	0
	SEM 24	0,80	436,41	8	2	4	137,17	0
	SEM 27	2,07	372,37	5	2	2	109,48	0
	SEM 29	2,42	413,81	6	2	3	111,99	0
	SEM 30	2,53	458,26	6	2	3	111,99	0
	SEM 31	1,08	424,36	8	4	2	110,07	0
	SEM 32	1,34	439,41	8	2	5	130,45	0
	SEM 33	1,05	469,44	9	2	6	139,68	0
	SEM 83	2,09	380,35	6	3	1	135,00	0
SEM 86	2,19	380,78	5	2	1	109,48	0	
Cromenos	SEM 36	1,88	392,20	5	3	3	102,01	0
	SEM 37	0,37	358,30	7	3	4	147,83	1
	SEM 39	0,68	373,36	7	3	5	120,47	0
	SEM 40	0,17	389,36	8	4	5	140,70	1
	SEM 42	0,45	359,33	7	4	4	131,47	0
	SEM 87	1,65	331,30	6	3	3	102,01	0

mLogp = predição de lipofilicidade; PM = peso molecular; nO+N = número de N e O aceptores de ligações de H; nOH+NH = número de NH e OH doadores de ligações de H; N rotb = número de ligações rotacionáveis; TPSA = área de superfície polar topológica; Nº violações = número de violações. Fonte: A autora.

5.4 AÇÃO DOS COMPOSTOS DA SÉRIE “SEM” SOBRE A VIABILIDADE DAS PLAQUETAS

Para o prosseguimento dos experimentos, avaliou-se a toxicidade dos compostos considerados mais promissores sobre plaquetas humanas utilizando-se o método de exclusão com azul de *Trypan*. Como é possível observar na Figura 11, os compostos não foram tóxicos para as plaquetas, uma vez que não houve diferença significativa entre o controle negativo para morte celular ($95,86 \pm 0,50\%$) e as três moléculas testadas, SEM 39 ($93,86 \pm 0,46\%$), SEM 40 ($93,70 \pm 0,60\%$) e SEM 42 ($94,93 \pm 1,22\%$).

Figura 11 - Efeito dos cromenos (500 μM) sobre a viabilidade de plaquetas



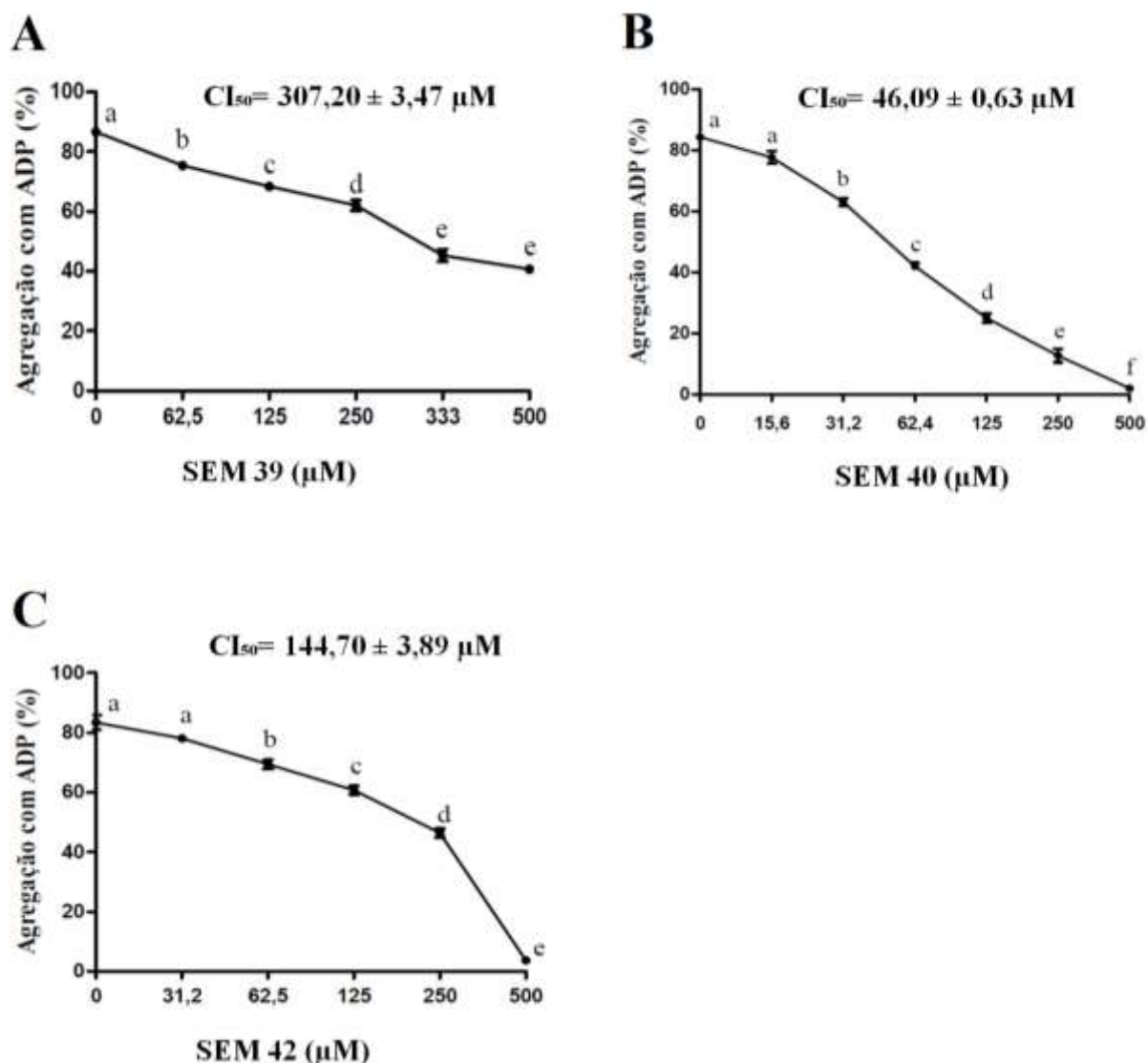
CN (Controle negativo de viabilidade) – *Fix&Perm*. CP (Controle positivo de viabilidade) – DMSO 0,5% v/v. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média; N = 3. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni ($P > 0,05$). Fonte: A autora.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM RELAÇÃO À SUA CONCENTRAÇÃO E AO TEMPO DE INCUBAÇÃO

5.5.1 Avaliação do efeito concentração-resposta e determinação da CI_{50} dos compostos selecionados

Para verificar se o efeito dos compostos selecionados era dependente da dose, foram realizadas diluições seriadas dos mesmos e verificados os percentuais de agregação dos PRPs tratados com estas diluições. A partir das curvas obtidas, também foi calculada a CI_{50} . Nesses experimentos, além do ADP e da epinefrina, também foi avaliado o efeito dos compostos na agregação induzida por colágeno. Ao analisar a Figura 12, é possível concluir que, quando o ADP foi empregado como agonista, o efeito antiagregante do SEM **39**, **40** e **42** reduz em conformidade com a diminuição da concentração testada. A melhor CI_{50} encontrada a partir da estimulação com o agonista ADP foi alcançada com o SEM **40** ($46,09 \pm 0,63 \mu\text{M}$), o SEM **42** ($144,70 \pm 3,89\mu\text{M}$) obteve a segunda melhor CI_{50} e o SEM **39** ($307,2 \pm 3,47 \mu\text{M}$) a pior.

Figura 12 - Curvas concentração resposta dos três compostos selecionados utilizando-se difosfato de adenosina (ADP - 10 μM) como agonista

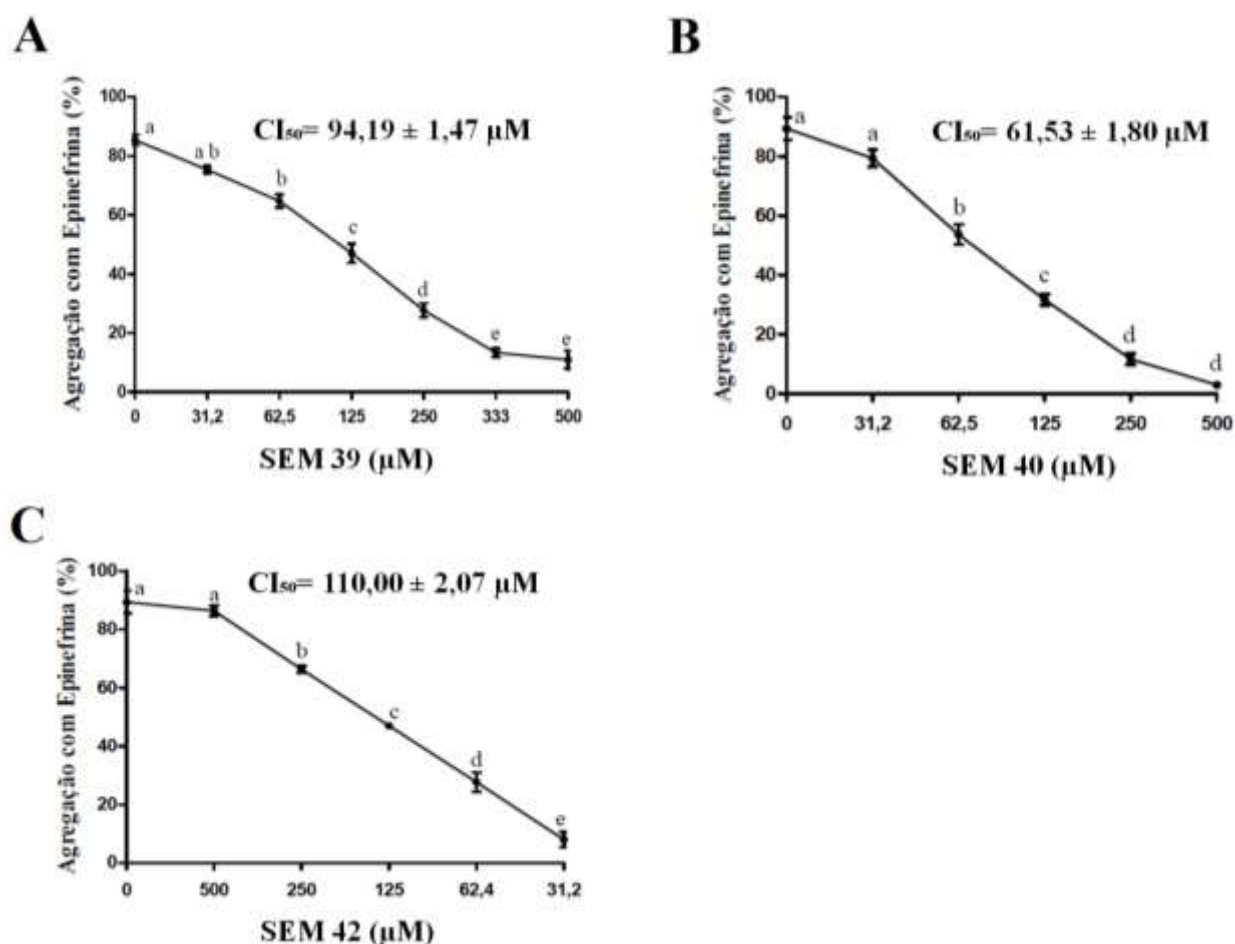


Painel A: Curva concentração-resposta do composto SEM 39. Painel B: Curva concentração-resposta do composto SEM 40. Painel C: Curva concentração-resposta do composto SEM 42. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média; $N = 3$. CI_{50} – Concentração inibitória de 50%; Letras “a”, “b” e “c” – Pontos apresentados com letras diferentes possuem diferenças significativas entre si, pontos apresentados com letras iguais não obtiveram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Fonte: A autora.

De forma similar ao ADP, ao observar a Figura 13, é possível concluir que, quando a epinefrina é utilizada como agonista, o efeito antiagregante também diminui a medida a concentração dos compostos diminui. O composto SEM 40 obteve novamente a CI_{50} mais expressiva ($61,53 \pm 1,80 \mu\text{M}$). Diferentemente do ADP, no caso da

epinefrina, o SEM 39 obteve a segunda melhor CI_{50} ($94,19 \pm 1,47 \mu\text{M}$), seguido do SEM 42 que apresentou uma CI_{50} de $110,00 \pm 2,07 \mu\text{M}$.

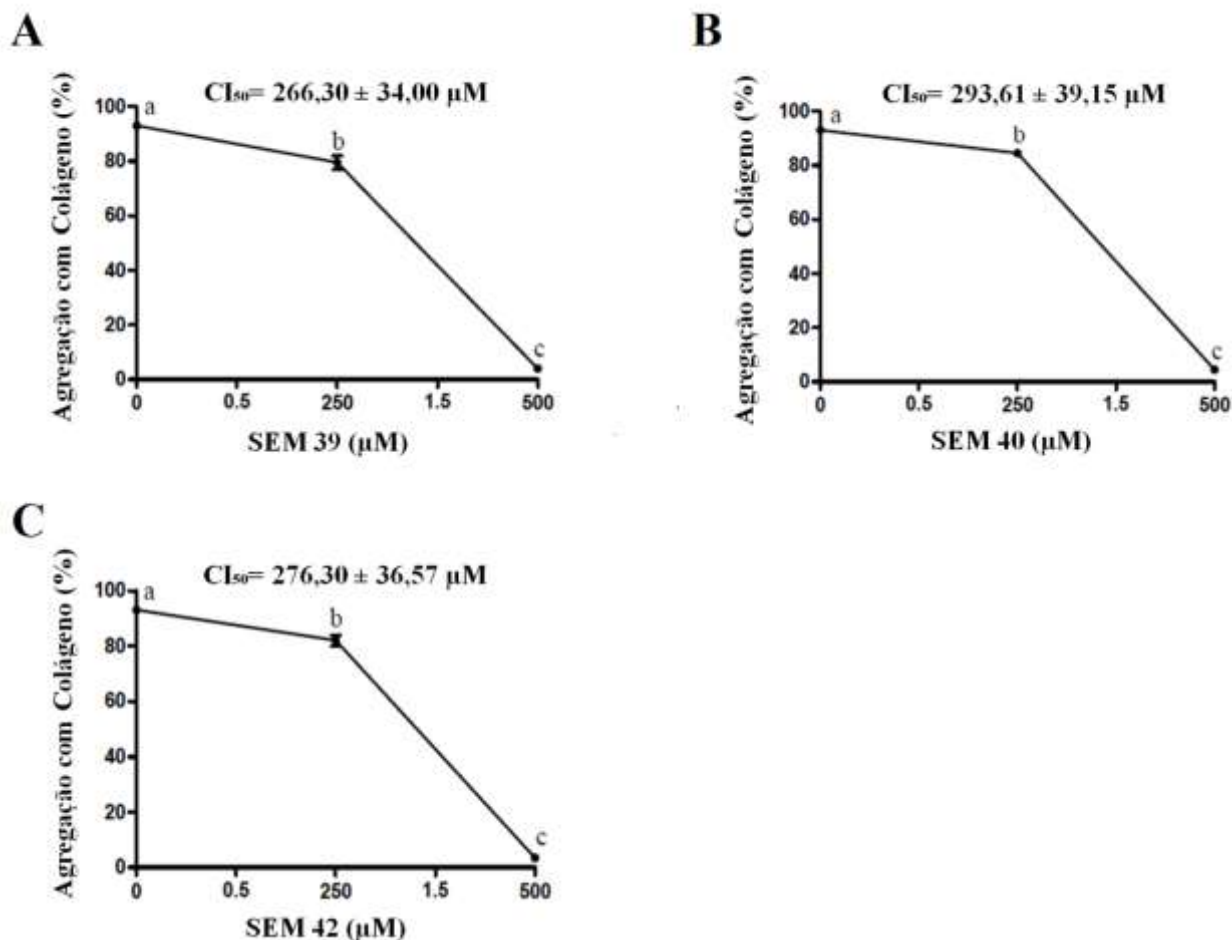
Figura 13 - Curvas concentração resposta dos três compostos selecionados utilizando-se epinefrina ($5 \mu\text{g/mL}$) como agonista



Painel A: Curva concentração-resposta do composto SEM 39. Painel B: Curva concentração-resposta do composto SEM 40. Painel C: Curva concentração-resposta do composto SEM 42. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média; $N = 3$. CI_{50} – Concentração inibitória de 50%; Letras “a”, “b” e “c” – Pontos apresentados com letras diferentes possuem diferenças significativas entre si, pontos apresentados com letras iguais não obtiveram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. Fonte: A autora.

Com relação ao uso de colágeno como agonista, os três compostos (SEM 39, 40 e 42) obtiveram perfis de concentração-resposta muito similares (Figura 14). Da mesma forma, suas CI_{50} foram semelhantes entre si e em geral maiores que para os outros agonistas testados (SEM 39 = $266,30 \pm 34,00 \mu\text{M}$, SEM 40 = $293,61 \pm 39,15 \mu\text{M}$ e SEM 42 = $276,30 \pm 36,57 \mu\text{M}$).

Figura 14 - Curvas concentração resposta dos três compostos selecionados utilizando-se colágeno (2 µg/mL) como agonista



Painel A: Curva concentração-resposta do composto SEM 39. Painel B: Curva concentração-resposta do composto SEM 40. Painel C: Curva concentração-resposta do composto SEM 42. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média; N = 3. CI₅₀ – Concentração inibitória de 50%; Letras “a”, “b” e “c” – Pontos apresentados com letras diferentes possuem diferenças significativas entre si, pontos apresentados com letras iguais não obtiveram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$). ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. Fonte: A autora

5.5.2 Determinação do efeito tempo-resposta dos compostos selecionados

Para avaliar se o efeito antiagregante dos compostos era dependente do tempo de incubação, as três substâncias selecionadas foram incubadas com PRP nas suas concentrações de CI₅₀ por 5 e 15 minutos, em seguida, foram estimulados por ADP ou epinefrina. Como é possível observar na Tabela 6, a agregação média das plaquetas estimuladas com ADP após 15 minutos de tratamento com os compostos foi significativamente maior do que a agregação média obtida após 5 minutos de incubação

(SEM 39: P= 0,003; SEM 40: P= 0,041; SEM 42: P= 0,044). Quando o agonista utilizado foi a epinefrina, o SEM 40 foi o único composto que a agregação média dos dois tempos não foi significativamente diferente entre si (P= 0,626). Para o SEM 39 e o SEM 42, a agregação média após 15 minutos de agregação foi significativamente maior (P= 0,0279 e P= 0,0027, respectivamente).

Tabela 6 - Efeito dos compostos SEM 39, 40 e 42 em relação ao tempo de incubação (5 e 15 minutos)

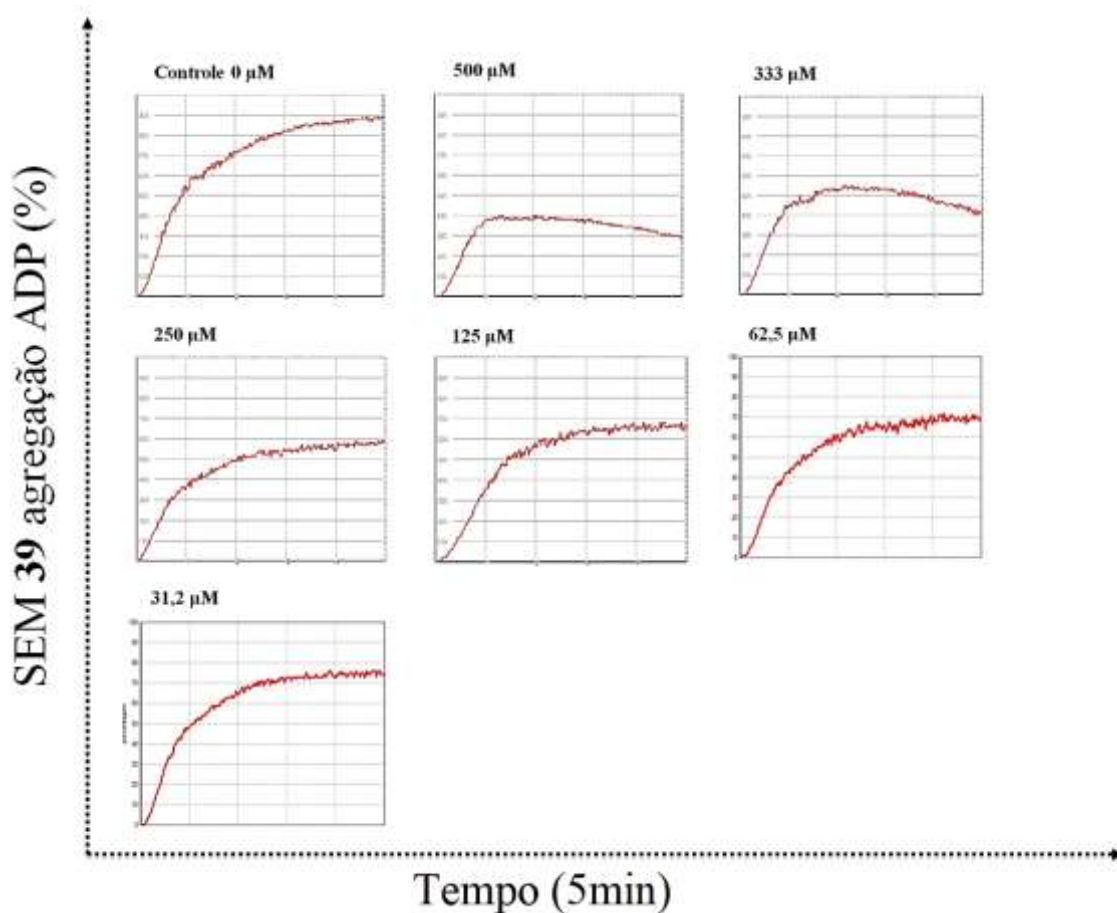
Tratamento	ADP		Epinefrina	
	Média ± EP (%)		Média ± EP (%)	
	5 min	15 min	5 min	15 min
Controle	83,3 ± 2,4	86,6 ± 1,4	83,5 ± 0,8	87,4 ± 0,8
SEM 39 (62,5 µM)	62,0 ± 1,7	93,6 ± 2,0*	64,6 ± 2,2	73,6 ± 2,4*
SEM 40 (31,2 µM)	63,0 ± 1,1	85,3 ± 3,6*	72,3 ± 2,8	69,0 ± 3,0
SEM 42 (110,0 µM)	69,3 ± 1,4	80,0 ± 2,0*	66,3 ± 1,2	77,3 ± 0,8*

ADP – difosfato de adenosina; EP – erro padrão da média; Controle – dimetilsulfóxido 0,5% v/v. As amostras foram incubadas durante 5 e 15 minutos em suas respectivas CI₅₀. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média; N = 3. Teste t de Student para amostras independentes. Fonte: A autora.

5.6 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS

Para melhor entender o mecanismo de ação dos três compostos selecionados, avaliou-se os perfis das curvas de agregação quando o PRP foi tratado com os compostos em diferentes concentrações e estimulado por ADP, epinefrina ou colágeno. Como é possível observar na Figura 15, na agregação estimulada pelo ADP, o SEM 39 em suas maiores concentrações (500 µM e 333 µM) reverteu totalmente ou parcialmente a primeira onda de agregação e, conseqüentemente, inibiu a segunda onda. Nas concentrações subsequentes, a segunda onda foi parcialmente inibida, mas não houve alteração da primeira.

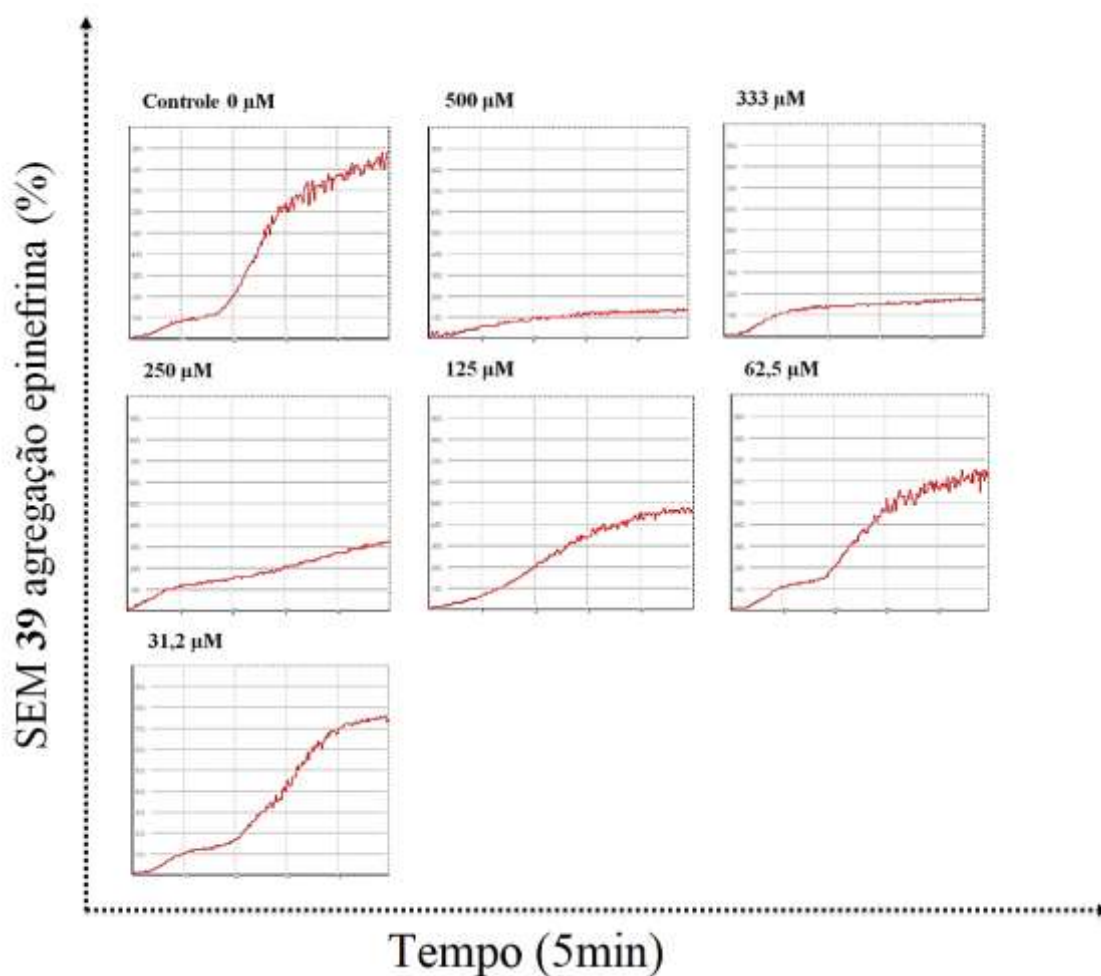
Figura 15 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP (10 μM) com diferentes concentrações do SEM 39



ADP – difosfato de adenosina; Controle – DMSO 0,5% v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

Quando o agonista utilizado foi a epinefrina (Figura 16), o SEM 39 em suas maiores concentrações (500 μM e 333 μM) inibiu totalmente a segunda onda de agregação e parcialmente a primeira. Nas demais concentrações, o composto inibiu parcialmente a segunda onda, não alterando a primeira.

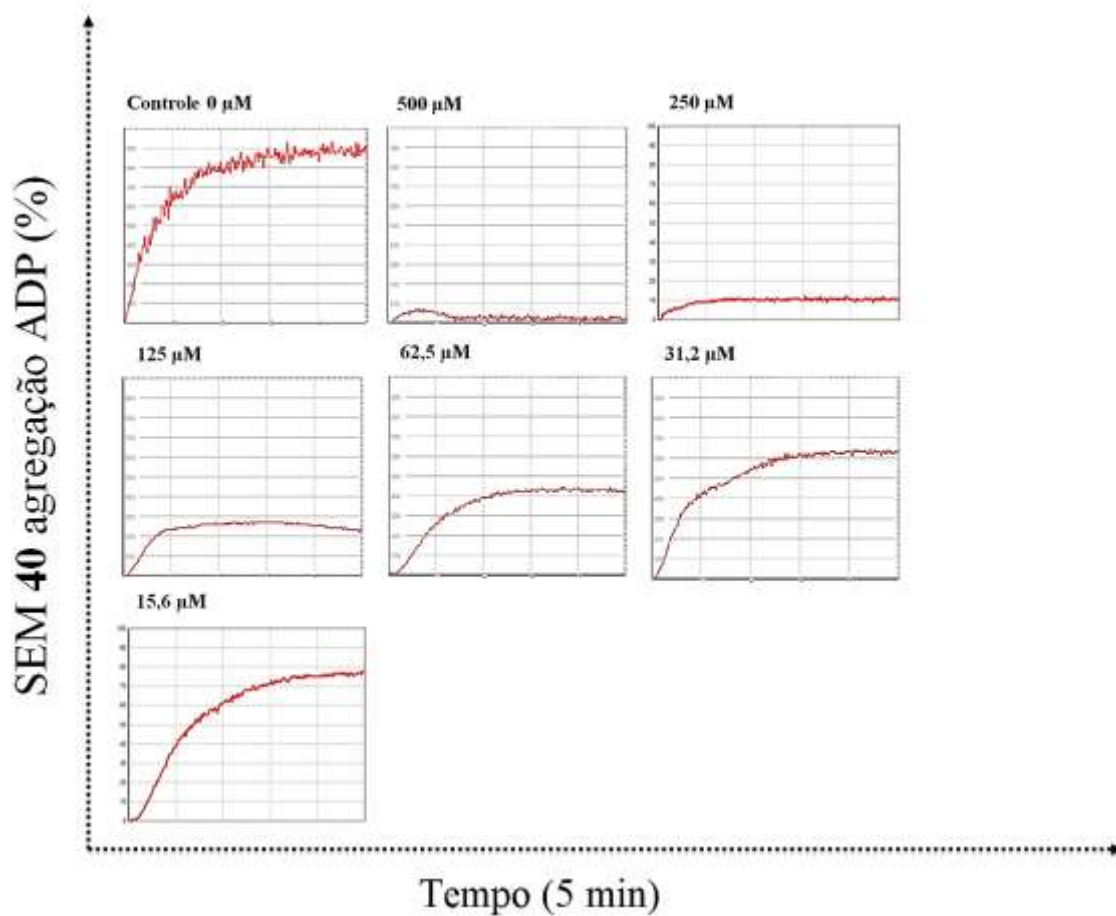
Figura 16 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina ($5\mu\text{g/mL}$) com diferentes concentrações do SEM 39



Controle – DMSO 0,5% v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

Em relação ao composto SEM 40 (Figura 17), este inibiu totalmente e parcialmente a primeira onda de agregação nas maiores concentrações (500 μM , 333 μM e 250 μM) e, semelhante ao que ocorreu com o SEM 39, ele inibiu parcialmente a segunda onda de agregação nas demais concentrações.

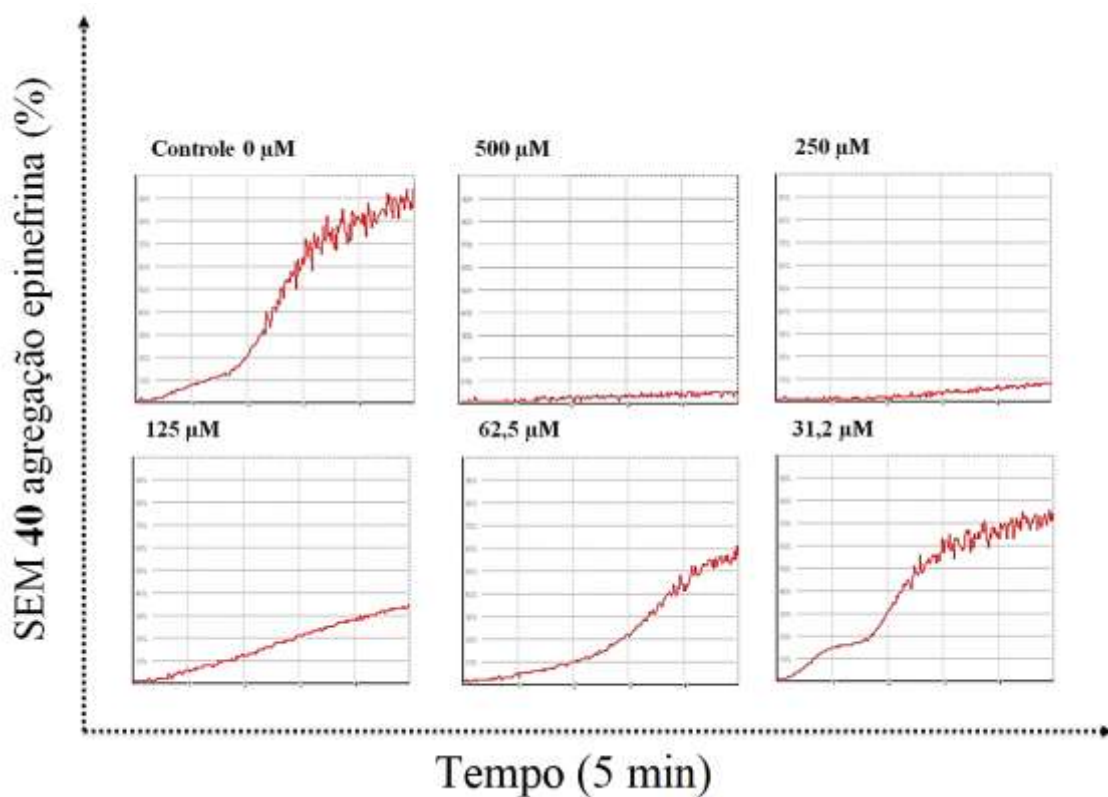
Figura 17 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP (10 μM) com diferentes concentrações do SEM 40



ADP – difosfato de adenosina; Controle – DMSO 0,5% v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

Quando a epinefrina foi utilizada como agonista (Figura 18), o SEM 40 apresentou perfis de curvas similares às aquelas obtidas quando o ADP foi utilizado, ou seja, nas duas maiores concentrações (500 μM e 250 μM) a primeira onda foi totalmente ou parcialmente inibida, enquanto nas demais concentrações, a segunda onda foi parcialmente inibida.

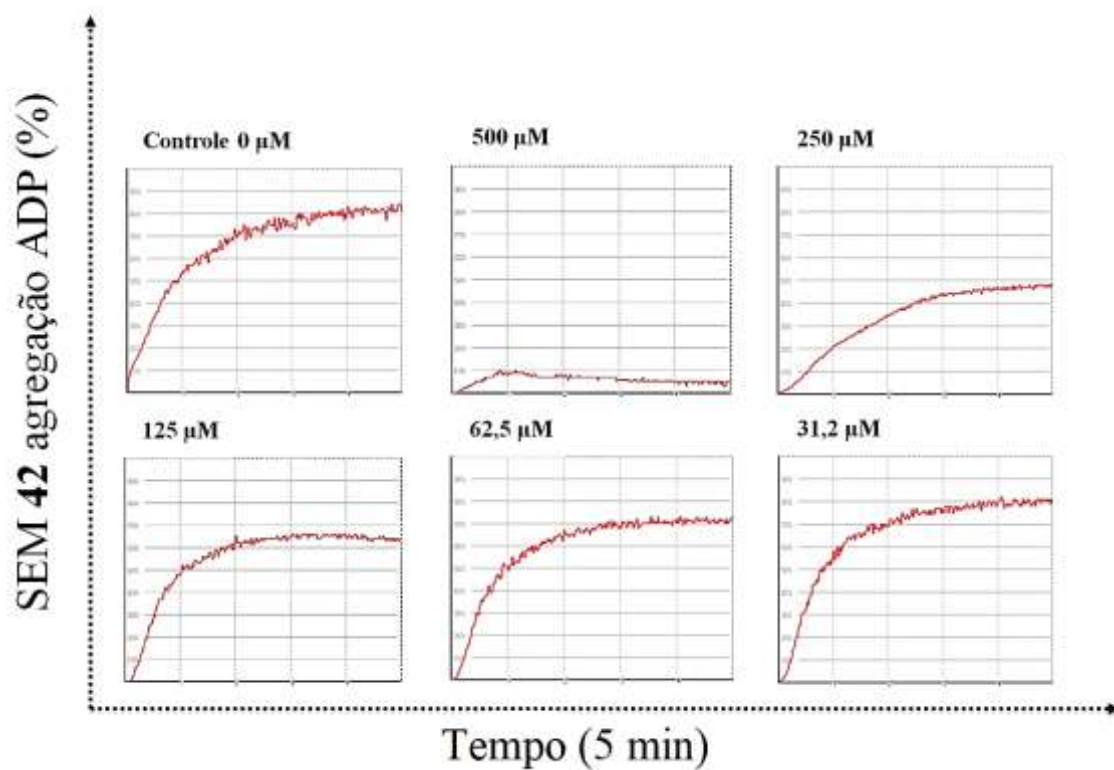
Figura 18 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina (5 μ g/mL) com diferentes concentrações do SEM 40



Controle – DMSO 0,5% v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

Por fim, o composto SEM 42, assim como o SEM 39 e o 40, na sua maior concentração (500 μ M) causou reversão e conseqüente inibição total da primeira onda de agregação estimulada pelo ADP (Figura 19). Nas demais concentrações, a inibição da segunda onda de agregação foi parcial.

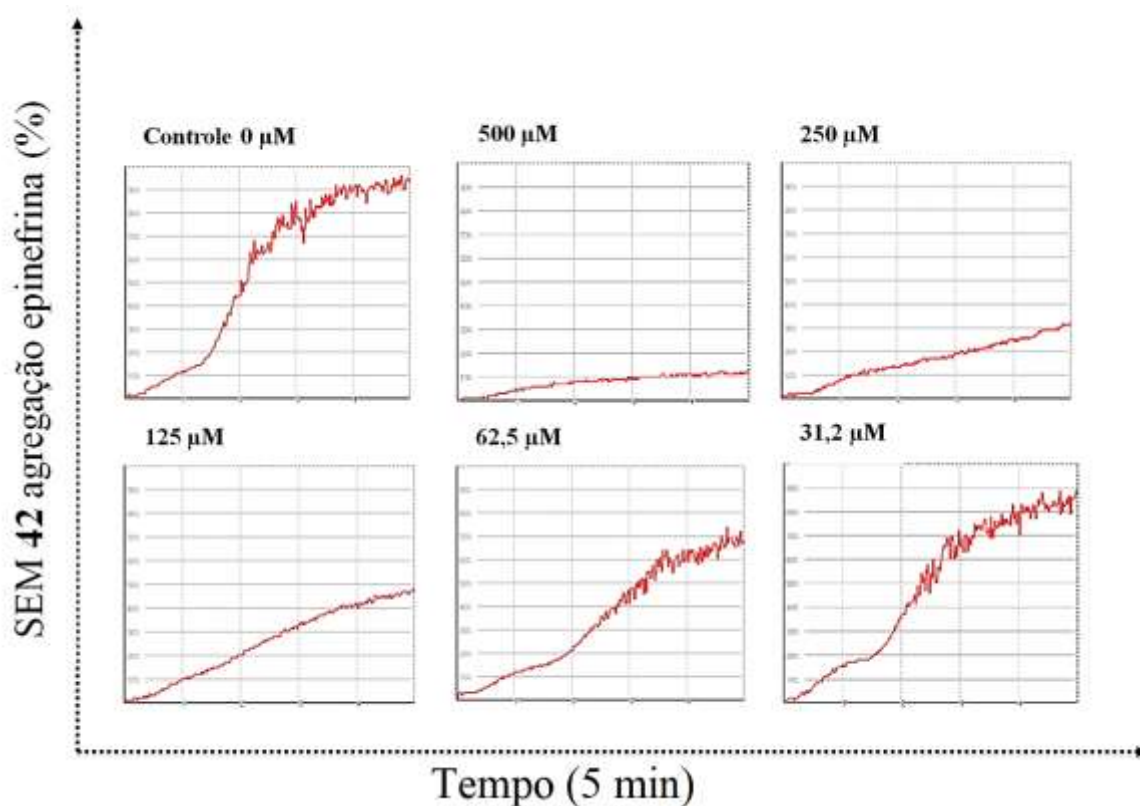
Figura 19 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP (10 μM) com diferentes concentrações do SEM 42



ADP – difosfato de adenosina; Controle – DMSO 0,5% v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

Com relação à epinefrina (Figura 20), o composto SEM 42 também interferiu na primeira onda de agregação na maior concentração (500 μM) e diminuiu a propagação de sinal (segunda onda) nas demais concentrações.

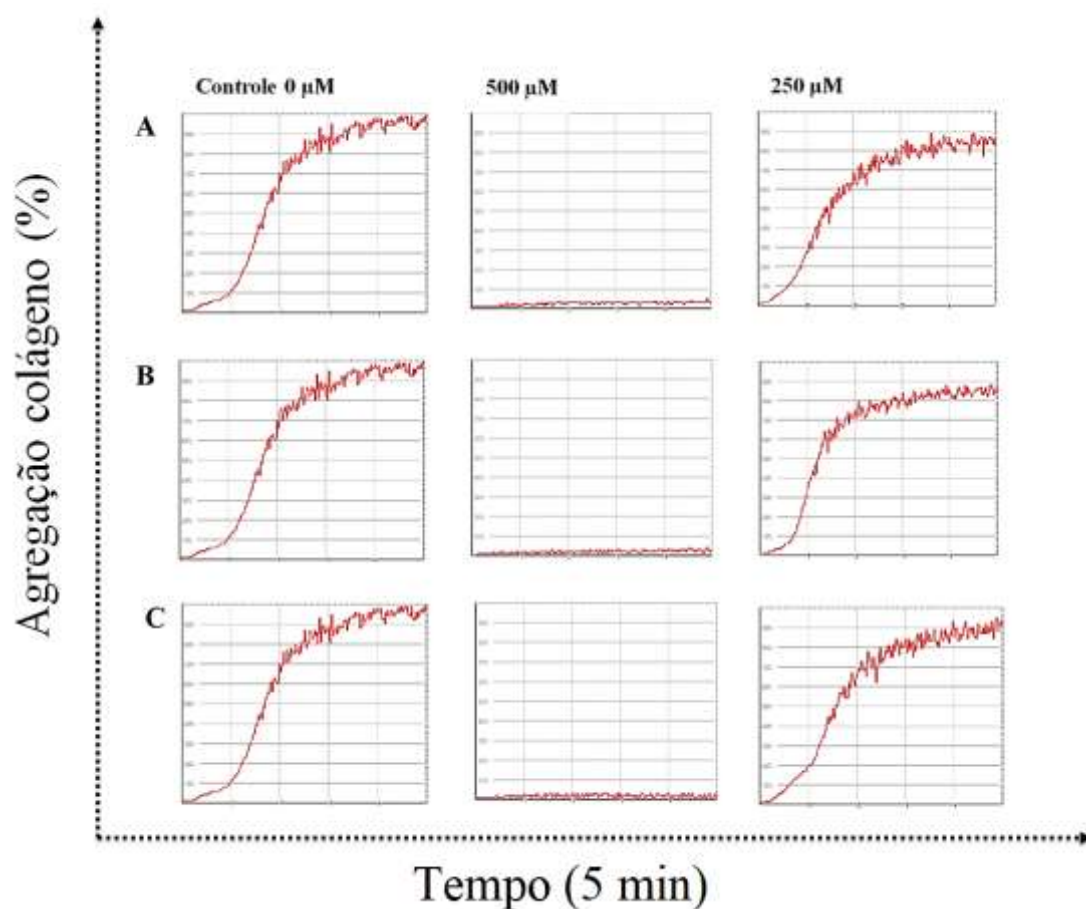
Figura 20 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por epinefrina ($5\mu\text{g/mL}$) com diferentes concentrações do SEM 42



Controle – DMSO 0,5 % v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

Por fim, o último agonista testado foi o colágeno, ao observar a Figura 21, nota-se que os três compostos agiram de forma semelhante nas concentrações testadas, ou seja, na concentração de $500\ \mu\text{M}$ as três moléculas inibiram completamente as duas ondas da agregação (agregação média: SEM 39 = $4,0 \pm 1,0\%$; SEM 40 = $4,5 \pm 0,5\%$; SEM 42 = $3,5 \pm 0,5\%$), ao passo que, na concentração de $250\ \mu\text{M}$, os compostos já não conseguiram mais interferir nas curvas de agregação (agregação média: SEM 39 = $79,50 \pm 2,5\%$; SEM 40 = $84,5 \pm 0,5\%$; SEM 42 = $82,0 \pm 2,0\%$).

Figura 21 - Perfis das curvas de agregação plaquetária induzidas por colágeno (2 μ g/mL) com diferentes concentrações dos cromenos da série “SEM”



Painel A: Curvas de agregação do SEM 39; Painel B: Curvas de agregação do SEM 40; Painel C: Curvas de agregação do SEM 42. Controle – DMSO 0,5 % v/v. Imagens ilustrativas; N = 3. Fonte: A autora.

5.7 ATIVIDADE DO SEM 39, 40 E 42 SOBRE A EXPRESSÃO MEMBRANAR DA GpIIb/IIIa ATIVADA E DE P-SELECTINA

Para investigar se os compostos eram capazes de interferir na ativação plaquetária, avaliou-se o efeito do SEM 39 (94,2 μ M), 40 (61,5 μ M) e 42 (110,0 μ M) sobre a ativação da GpIIb/IIIa (PAC-1) e sobre a expressão membranar da P-selectina (CD62P) quando as plaquetas eram estimuladas com epinefrina. Como é possível observar na Tabela 7, todos os compostos inibiram a ativação das plaquetas uma vez que houve diminuição da expressão de ambos os marcadores de ativação. Destaca-se que as três moléculas foram mais eficientes em inibir a ativação da GpIIb/IIIa do que a

expressão de P-selectina, com exceção da SEM **39**, que inibiu expressivamente os dois marcadores.

Tabela 7 - Porcentagem de inibição da expressão de GpIIb/IIIa ativada (PAC-1) e de P-selectina (CD62P) pelos compostos SEM **39**, SEM **40** e SEM **42**

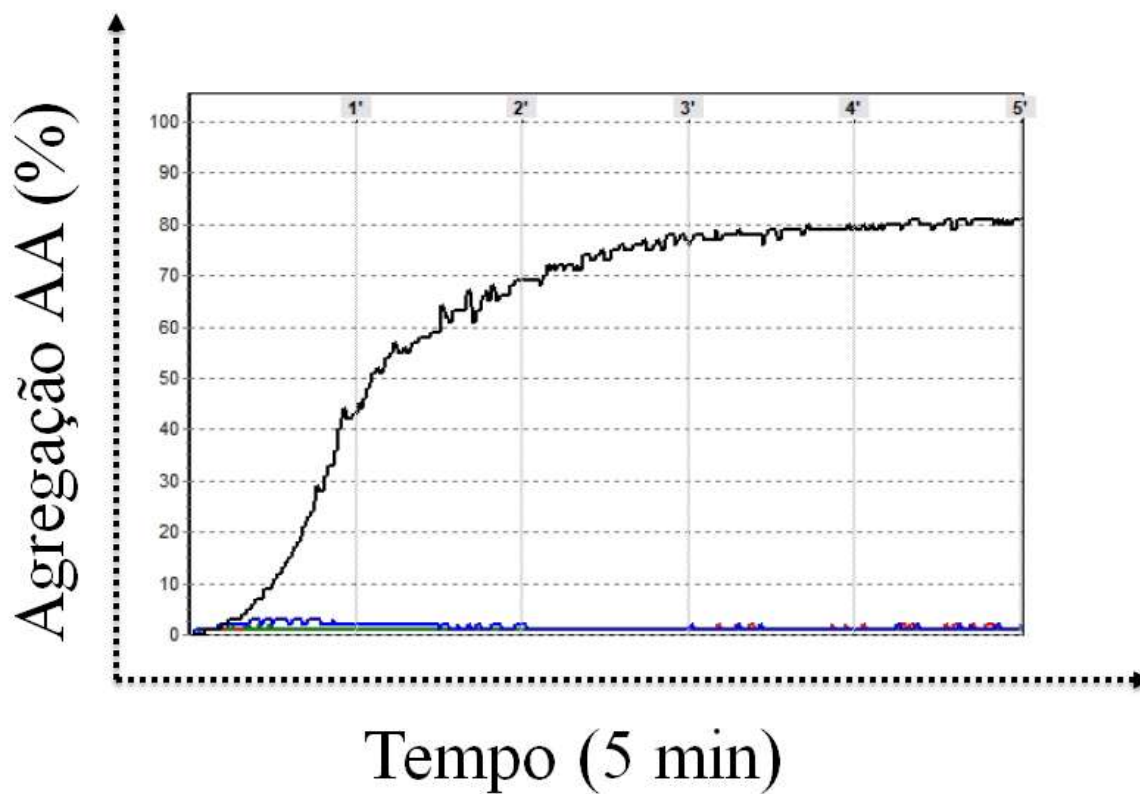
Tratamento	Inibição (%) após estímulo com epinefrina	
	PAC- 1	CD62P
SEM 39 (62,5 µM)	70,2	45,5
SEM 40 (31,2 µM)	63,2	12,1
SEM 42 (110,0 uM)	62,7	14,2

A porcentagem (%) de inibição da expressão de PAC-1 e CD62P foi calculada a partir das intensidades de fluorescência médias (IFM) obtidas após a fusão dos arquivos com a ferramenta *File Merge*. Fonte: A autora.

5.8 AÇÃO DOS COMPOSTOS SEM **39**, SEM **40** e SEM **42** SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR AA

Para auxiliar na elucidação do mecanismo da ação antiagregante dos três compostos, avaliou-se a ação dos cromenos (31,2 µM) sobre a agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico. Ao observar a Figura 23, é possível constatar que a agregação plaquetária foi inibida quase que completamente pelo SEM **39**, **40** e **42**, com porcentagens de agregação de $2,0 \pm 1,0\%$, $1,5 \pm 0,5\%$ e $1,0 \pm 0,0\%$, respectivamente.

Figura 22 - Efeito dos compostos SEM 39, SEM 40 e SEM 42 sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico



AA: ácido araquidônico (500 μ M). Curva preta: Controle (DMSO 0,5% v/v); Curva azul: SEM 39; Curva vermelha: SEM 40; Curva verde: SEM 42. Imagem ilustrativa. N = 3. Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A busca por novos compostos-protótipos de fármacos para o manejo e tratamento das doenças que mais acometem pessoas no mundo, como as DCVs, é de vital interesse e, também, de certa urgência, posto que doenças como as que acometem o aparelho cardiovascular são de difícil tratamento farmacológico e os medicamentos disponíveis apresentam variados efeitos adversos e interações com alimentos e outros fármacos (BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018; XIANG et al., 2019).

No Brasil, as DCVs são uma das principais causas de morbimortalidade e resultam nos maiores gastos orçamentários do SUS. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no período de 2003 a 2013, treze medicamentos voltados para doenças que acometem o aparelho circulatório foram aprovados para uso no sistema público de saúde. Por mais que seja um número significativo de medicamentos, grande parcela desses são anticoagulantes e antiagregantes com mecanismos de ação semelhantes, fazendo com que exista uma carência de medicações com mecanismos de ação distintos o que dificulta o manejo para indivíduos com resistência ou contraindicações aos tratamentos habitualmente empregados, o que mostra a importância pela busca de novos agentes farmacológicos (BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018; COX, 2019).

As inovações tecnológicas que permitiram grandes avanços no estudo de macro e micromoléculas biológicas, bem como a criação de *softwares* que propiciam agilidade, somados a evolução na área da síntese orgânica, permitiram o planejamento e desenvolvimento de novas entidades químicas em maior quantidade, menor tempo e com estruturas químicas similares, sendo esse, um marco de grande valia para a busca por novos fármacos (HESSLER; BARINGHAUS, 2018; SCHNEIDER, 2017).

Diante do exposto, o presente estudo analisou o efeito de duas séries de compostos sintéticos, piranocumarinas (SEM 20, 21, 22, 23, 24, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 83 e 86) e cromenos (SEM 36, 39, 40, 42 e 87), além da molécula precursora de ambas (SEM 19), sobre a hemostasia.

O primeiro passo para a realização do estudo foi efetuar uma triagem com todos os compostos a fim de avaliar seu efeito sobre a hemostasia primária, ou seja, a agregação de plaquetas. Para tanto, as plaquetas tratadas com os compostos foram

estimuladas por ADP e epinefrina, dois importantes agonistas plaquetários. Primeiramente, testou-se a molécula precursora, SEM 19, em elevada concentração (500 μM), e constatou-se que a mesma inibiu significativamente a agregação induzida por todos os agonistas testados, demonstrando o potencial da série. Semelhantemente, todos os compostos da classe das piranocumarinas também conseguiram inibir significativamente a agregação plaquetária quando em alta concentração.

Tsai e colaboradores (1998), ao analisarem compostos isolados da planta *Toddalia asiatica*, constataram que a piranocumarina denominada “braylin” (100 $\mu\text{g/mL}$), não conseguiu reduzir significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP de coelhos. Aida e colaboradores (1995), utilizando também plasma de coelhos, demonstraram que uma mistura de piranocumarinas (preapturinas A e B, na proporção 3:2) obtida *Peucedanum praeruptorum*, inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP (10 μM), porém, essa inibição foi menor quando comparada com as obtidas pelos demais agonistas (ácido araquidônico, colágeno e fator de ativação plaquetária) utilizados no trabalho.

Assim como no estudo de Aida e colaboradores (1995), a maioria das piranocumarinas avaliadas no presente estudo também obtiveram inibições menos expressivas quando a agregação foi induzida por ADP em comparação à epinefrina. Os compostos SEM 24, 32 e 33 foram os únicos em que a ação antiagregante foi superior no ADP. Esses compostos possuem em comum metoxilas (MeO) em seus radicais 1 e 2 (R^1 , R^2), diferentemente das demais moléculas, o que poderia justificar esse efeito diferenciado.

De forma semelhante às piranocumarinas, os cromenos também inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida pelos dois agonistas testados. Tal qual o presente trabalho, outros estudos encontrados na literatura já demonstraram que os cromenos e seus derivados possuem potente atividade inibitória frente à agregação plaquetária estimulada por diferentes agonistas como colágeno, ADP e epinefrina (KERI et al., 2014; MAZZEI et al., 1990). Segundo Mazzei e colaboradores (1988), a intensidade da atividade antiagregante dos cromenos relaciona-se intimamente com os grupamentos químicos presentes em cada radical da molécula chave. No estudo de Mazzei e colaboradores (1988), verificou-se que a presença de substituintes doadores de elétrons como hidroxila (OH), MeO e metila (CH_3) na posição 7 aumentou a atividade inibitória dos compostos. De forma semelhante, no presente trabalho, todos os

compostos testados possuem substituintes doadores de elétrons em seus radicais, o que justificaria o potente efeito inibitório apresentado pela maioria das moléculas. Contudo, é importante ressaltar que a presença de substituintes doadores de elétrons não é o único aspecto capaz de melhorar a atividade dos cromenos, uma vez que moléculas podem apenas compartilhar seus elétrons com o receptor de ação ao invés de doá-los completamente, essa ação causa uma ressonância entre receptor e elétrons que contribui também para o aumento da atividade inibitória.

Por fim, os resultados apresentados na Tabela 2 evidenciaram que a síntese e modificação das moléculas de piranocumarinas e cromenos aqui investigadas permitiram uma potencialização de efeito antiagregante e, conseqüentemente, melhora de desempenho destes compostos frente à agregação induzida por ADP e/ou epinefrina.

Apesar de todos os compostos apresentarem efeitos antiagregantes significativos, foram considerados promissores apenas os que obtiveram agregações médias inferiores a 50% após o tratamento. Essa definição é embasada na perspectiva de que, caso o composto não seja capaz de inibir a agregação em 50% já em alta dose, a CI_{50} calculada para o composto será superior à concentração de 500 μM , uma concentração já considerada elevada para estudos *in vitro* e que muito provavelmente seria inviável de ser atingida *in vivo*. Dentro deste parâmetro, os compostos SEM 19, 20, 23, 24 e 27 não foram considerados antiagregantes promissores, uma vez que apresentaram agregação média superior a 50% para pelo menos um dos agonistas utilizados na triagem. Com exceção do SEM 27, todos os demais são provenientes de uma mesma estrutura base, podendo assim sugerir que esse efeito diminuído esteja relacionado com a molécula geral ao invés de seus radicais. Interessante ressaltar que a substância precursora (SEM 19) foi classificada como não promissora, dessa forma, fica mais uma vez evidente que as mudanças realizadas nas estruturas químicas melhoraram o seu desempenho como antiagregante.

Posteriormente à triagem relacionada à hemostasia primária, foram realizadas avaliações do efeito dos compostos sobre a hemostasia secundária pela determinação do TP e do TTPa dos plasmas tratados com as piranocumarinas, os cromenos e a molécula precursora. Com a realização dos experimentos, constatou-se que apenas a molécula precursora (SEM 19) aumentou significativamente o tempo de ambos os ensaios, o que sugere que o SEM 19 seja capaz de interferir em um único ponto da via comum da coagulação ou que seja capaz de interferir em múltiplos pontos da cascata afetando,

assim, simultaneamente a via extrínseca e intrínseca da coagulação. O SEM 37 prolongou significativamente apenas o TP, o que indica que ele interfira nos processos da via extrínseca. O SEM 40 e 42 prolongaram apenas o TTPa, indicando que a interferência seja exclusiva na via intrínseca da coagulação.

O RNI é um cálculo de calibração padronizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e utilizado a fim de minimizar as variações de resultados do TP entre laboratórios que utilizam técnicas e reagentes diferentes entre si. Segundo a literatura, para que um indivíduo em terapia anticoagulante com varfarina seja considerado adequadamente anticoagulado, os valores de TP_{RNI} dos pacientes devem encontrar-se entre 2,0 e 3,0. Já em indivíduos que não utilizam fármacos anticoagulantes, o valor de TP_{RNI} esperado situa-se na faixa de 1,0 a 1,3 (ARAÚJO; DOMINGUES; VAN BELLEN, 2014; SERRALVO; ZAMBOTI; BREGANO, 2015; SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2018). Embora os compostos SEM 19 e 37 tenham significativamente aumentado os valores de TP, essas alterações não foram suficientes para alterar expressivamente o TP_{RNI} , uma vez que seus valores de TP_{RNI} encontram-se dentro da faixa de normalidade. Dessa forma, conclui-se que nem o cromeno e nem a molécula precursora apresentaram atividade anticoagulante clinicamente promissora.

Os compostos SEM 19, 40 e 42 foram capazes de prolongar significativamente o TTPa, porém, similarmente ao TP, o TTPa também possui uma razão de normalização em que os valores para indivíduos clinicamente saudáveis variam de 1,0 a 1,5 (SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2018). Desse modo, nem a estrutura precursora nem os dois cromenos demonstraram efeito considerado clinicamente significativo, uma vez que o $TTPa_{razão}$ das três moléculas se assemelhou ao resultado de indivíduos que não fazem o uso de anticoagulantes.

Por fim, os resultados obtidos nas triagens realizadas no presente trabalho demonstraram que nenhum composto avaliado possui promissora atividade anticoagulante, porém, tendo em vista que a molécula precursora, bem como três dos outros compostos, causou um pequeno prolongamento do TP e/ou TTPa, é possível ponderar que novas modificações estruturais poderiam aprimorar este efeito sobre a coagulação de forma a se ter um candidato a protótipo para novos fármacos anticoagulantes.

Clinicamente, é de grande benefício que as substâncias testadas tenham apenas efeito sobre uma das fases da hemostasia, haja visto que, ao atuar sobre ambas (fase

plaquetária e coagulação) o risco de efeitos adversos, como sangramentos espontâneos, seria inegável (HOFFBRAND; MOSS, 2013). Dessa forma, levando-se em consideração que tanto as piranocumarinas como os cromenos desempenharam efeitos promissores apenas na hemostasia primária, pode-se concluir que todos estes compostos testados seriam interessantes para dar continuidades aos testes.

Como citado acima, as análises *in silico* representam uma fase de suma importância na avaliação de um protótipo farmacológico, pois além de fornecer *feedback* sobre estudos como a biodisponibilidade, os dados computacionais colaboram para reduzir erros e aleatoriedades, tornando o estudo mais eficiente e assertivo (SCHNEIDER, 2017). Considerando todas essas questões, testes *in silico* foram utilizados para explorar a predisposição teórica dos compostos da série “SEM” a efeitos de toxicidade, bem como para avaliar as suas características físico-químicas.

Ao analisar a Tabela 4, constatou-se que todos os compostos do grupo das piranocumarinas manifestaram baixo risco teórico para os parâmetros de mutagenicidade e tumorigenicidade, por outro lado, essas substâncias apresentam elevado risco de efeito irritativo e efeito negativo sobre a reprodução. Os cromenos, por sua vez, apresentaram menor toxicidade teórica quando comparados com o grupo das piranocumarinas, uma vez que todos os compostos do grupo apresentaram baixo risco de toxicidade teórica.

O composto SEM 19, assim como as piranocumarinas, apresentou elevado risco de efeito negativo sobre a reprodução. Em razão de ser o precursor de ambas as séries, é possível presumir que a substituição da carbonila para a síntese dos cromenos tornou essas estruturas menos tóxicas. Por outro lado, a carbonila, juntamente com a adição de elementos da família dos halogênios, podem ter sido os responsáveis pelo aumento do risco teórico de toxicidade das piranocumarinas em relação à molécula precursora.

Martin e colaboradores (2018), ao avaliarem a citotoxicidade *in vitro* dessa mesma série de compostos sobre linhagens de células de leucemia resistentes a fármacos e sua sublinhagem sensível a alguns medicamentos, constataram que as piranocumarinas apresentavam maior citotoxicidade do que os cromenos. Esses resultados reforçam a hipótese levantada por meios dos programas computacionais de que as piranocumarinas possuem maior probabilidade de apresentarem alto risco de toxicidade quando comparado com os cromenos.

As regras propostas por Lipinski e colaboradores (2001) são um conjunto de parâmetros baseados nas propriedades físico-químicas de uma molécula com o intuito de avaliar *in silico* o seu potencial para ser administrado por via oral em humanos, bem como a sua farmacocinética. De acordo com esses parâmetros, para uma substância ser bem sucedida, ela necessita apresentar mLogP menor que cinco, peso molecular inferior a 500, número de aceptores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 10, e número de doadores de ligação de hidrogênio igual ou inferior a cinco. Além disso, Veber e colaboradores (2002) propuseram outros dois parâmetros que influenciariam na absorção e biodisponibilidade oral, sendo assim, as moléculas devem dispor de 10 ou menos ligações rotacionáveis e TPSA inferior a 140.

Levando em consideração todos os parâmetros computacionais citados, na classe das piranocumarinas, o composto SEM 22 violou a regra de TPSA, o que, teoricamente, pode interferir na absorção intestinal completa e penetração da barreira hematoencefálica dessa molécula (CLARK; PICKETT, 2000). Dentre os cromenos, os compostos SEM 37 e 40 também obtiveram resultados superiores aos de referência para a TPSA. Contudo, ressalta-se que a violação de uma das regras de Lipinski ou Veber não inviabilizaria a utilização dessas moléculas para posteriores estudos *in vivo*, tendo em vista que aproximadamente 10% dos fármacos de uso oral violam pelo menos um dos parâmetros propostos (CLARK; PICKETT, 2000; LIPINSKI et al., 2001; LIPINSKI et al., 2012). Diante do exposto, no que diz respeito aos parâmetros propostos por Lipinski ou Veber, todos os compostos avaliados apresentaram-se promissores.

Ao compilar todos os resultados obtidos nas triagens e nas avaliações *in silico*, optou-se por não dar seguimento aos estudos com a classe das piranocumarinas, haja visto que, por mais que os resultados de agregação plaquetária se apresentaram promissores, estes foram inferiores aos obtidos com os cromenos. Além disso, a predição da toxicidade evidenciou possíveis eventos indesejáveis que podem vir a ocorrer caso essas moléculas sejam testadas *in vivo*.

A respeito dos cromenos, todas as moléculas demonstraram significativa inibição da agregação plaquetária e apresentaram resultados desejáveis nos testes *in silico*. Por esses motivos, a classe dos cromenos foi escolhida para o prosseguimento dos estudos. Dentre esses, foram selecionados três compostos, sendo eles: SEM 39, 40 e 42. A escolha foi baseada no desempenho das moléculas nos testes de triagem e por possuírem estruturas similares, o que é interessante, uma vez que seria possível, com a continuação

dos estudos, analisar a relação estrutura-atividade e a correlação destas com intensificação ou decréscimo da atividade.

O termo “estrutura privilegiada” é muito utilizado para designar moléculas de fácil manuseio e fornecedoras de ligantes úteis para diversos tipos de receptores, bem como alvos enzimáticos a partir de pequenas modificações estruturais. Ainda, estas estruturas normalmente concebem séries de substâncias semelhantes que, na maioria das vezes, são fiéis às características e ações do seu principal análogo (GASPAR, 2014; KERI et al., 2014). Contudo, essa identidade não garante que todos os compostos da série terão baixa toxicidade e alta biodisponibilidade. Substâncias privilegiadas geralmente são rígidas e possuem estrutura base heterocíclica assim como os cromenos que, diante de tantos aspectos positivos, desempenham e continuam a desempenhar um papel crucial na busca por novos fármacos (KERI et al., 2014).

Tendo selecionado os compostos que prosseguiriam com os estudos, o passo seguinte foi avaliar se os três cromenos eram tóxicos para as plaquetas, uma vez que Martin e seus colaboradores (2018) demonstraram possíveis potenciais citotóxicos dessas mesmas moléculas.

A investigação do efeito dos compostos sobre a viabilidade das plaquetas foi realizada por meio do método de exclusão por azul de *Trypan* (Figura 11) em que verificou-se que o SEM **39**, **40** e **42** não atuam como agentes tóxicos para as plaquetas, mesmo quando utilizados em elevada concentração (500 μ M). Pode-se assim concluir que o efeito antiagregante dos compostos está intimamente ligado a inibições dos processos fisiológicos das plaquetas e não a uma perda de viabilidade das mesmas, ainda, é possível citar que tal resultado é favorável para possíveis estudos *in vivo*.

Dispondo das informações de que os três compostos possuem interessante atividade antiagregante, que detêm características de toxicidade teórica e físico-químicas favoráveis e que não foram nocivos para as plaquetas, avaliou-se se o efeito antiagregante observado era dependente do tempo de incubação e da concentração de cada molécula.

Ao observar as Figuras 12, 13 e 14 e a Tabela 6, é possível constatar que os três compostos dependem da concentração para exercer o seu efeito antiagregante, porém, esse efeito não é dependente do tempo de incubação, pelo contrário, um aumento no tempo de incubação reduz o efeito dos compostos sobre as plaquetas. Uma possível explicação para estes resultados é que um maior tempo de incubação e, portanto, maior

tempo de contato com o plasma e seus constituintes, esteja causando uma instabilidade e/ou degradação da molécula. Isto poderia representar desafios em futuros estudos *in vivo*. Contudo, é importante constar que esta instabilidade/degradação não afetou o efeito que o SEM 40 tem sobre a agregação induzida por epinefrina, apenas a induzida por ADP, o que traz à luz a possibilidade de que metabólitos secundários dessa molécula possuam algum efeito antiagregante interessante e que, além disso, tenham mecanismo de ação distinto da molécula original, haja visto que o perfil de inibição foi diferente. Portanto, são necessários mais estudos para verificar esta hipótese de instabilidade/degradação dos compostos, bem como para avaliar por que o SEM 40 não perdeu a sua atividade apenas frente à epinefrina.

As melhores CI_{50} calculadas, tanto para o ADP quanto para a epinefrina, foram as do composto SEM 40, sendo que ambas CI_{50} foram semelhantes entre si ($46,09 \pm 0,6 \mu\text{M}$ e $61,53 \pm 1,8 \mu\text{M}$, respectivamente). Da mesma forma, o SEM 42 apresentou CI_{50} muito similares entre si, porém, com resultado mais promissor para a epinefrina ($110,00 \pm 2,0 \mu\text{M}$) do que para o ADP ($144,70 \pm 3,8 \mu\text{M}$). Esses dois compostos detêm em comum uma metoxila em seu substituinte R_1 e uma hidroxila em seu R_2 , o que pode estar relacionado com os seus efeitos similares, independentemente do agonista empregado. O SEM 39 possui metoxila tanto no seu R_1 quanto em seu R_2 , o que poderia explicar porque seu efeito foi tão diferente dos outros, sua CI_{50} para a epinefrina ($94,19 \pm 1,4 \mu\text{M}$) foi três vezes menor do que para o ADP ($307,2 \pm 3,4 \mu\text{M}$). Diante do exposto, é possível sugerir que os valores mais baixos de CI_{50} , bem como uma boa atividade frente à epinefrina, estão relacionados com o grupamento funcional estabelecido em R_2 . Quando o colágeno foi utilizado como agonista, as CI_{50} estabelecidas apresentaram-se quase que idênticas para as três substâncias ($266,3 \pm 34,0 \mu\text{M}$ para o SEM 39, $293,6 \pm 39,1$ para o SEM 40 e $276,3 \pm 36,5 \mu\text{M}$ para o SEM 42).

Semelhante aos achados do presente estudo, Mazzei e colaboradores (1988), ao testarem um conjunto de cromenos, também obtiveram CI_{50} mais elevadas quando os agonistas utilizados foram o ADP e o colágeno, com valores que alternavam entre $200 \mu\text{M}$ a $1000 \mu\text{M}$ e $130 \mu\text{M}$ a $1000 \mu\text{M}$, respectivamente. Segundo os autores, as CI_{50} variaram conforme os grupamentos funcionais de cada radical, o que reforça os resultados encontrados no presente trabalho.

O teste de agregação plaquetária tem por objetivo avaliar *in vitro* a função das plaquetas por meio de investigações sobre as diferentes vias de ativação plaquetária. O

princípio do teste é baseado em um cálculo sobre alterações na transmitância da luz, uma vez que, ao adicionar agonistas, a transmissão de luz é diminuída devido à alteração no formato das plaquetas (que passam de discoide a esféricas) seguido por um aumento gradativo na passagem da luz em virtude da formação de agregados plaquetários, o que torna o meio mais claro (BERNARDI; MOREIRA, 2004).

A ativação plaquetária como reflexo do estímulo pelo agonista induz a uma resposta bifásica de uma primeira onda que compreende uma agregação reversível seguida por uma agregação irreversível que é denominada segunda onda (PANICCIA, 2015). A primeira onda de agregação é dependente dos processos de transdução de sinais que levam à ativação transitória da plaqueta e que são desencadeados pela ligação do agonista (que foi adicionado ao PRP) ao seu receptor específico na membrana plaquetária. Essa fase da curva de agregação é também dependente da ativação do receptor GpIIb/IIIa. A segunda onda, por sua vez, depende da amplificação do sinal pró-agregante. Essa amplificação de sinal é realizada pelas próprias plaquetas que foram transitoriamente ativadas durante a primeira onda e pode ocorrer por dois principais mecanismos: pela secreção dos grânulos plaquetários ricos em ADP e pela produção de TxA2 pelas plaquetas (BERNARDI; MOREIRA, 2004; ZHOU; SCHMAIER, 2005).

Diante do exposto, para tentar elucidar o mecanismo pelo qual os compostos estão inibindo a agregação plaquetária, avaliou-se os perfis das curvas de agregação obtidas após o tratamento do PRP com os mesmos. Quando utilizados em elevadas concentrações, é comum os compostos produzirem uma inibição tão forte nas vias de sinalização da plaqueta que a agregação não chega a acontecer ou acontece de forma insípida, o que torna impossível qualquer tipo de análise. Por isso, as observações mais relevantes para a elucidação dos mecanismos de ação costumam ser feitas ao observar as curvas geradas após o tratamento das plaquetas com concentrações intermediárias e mais próximas das CI₅₀.

No presente trabalho, com exceção do SEM 39 na agregação induzida por ADP, todas as moléculas estudadas inibiram quase que totalmente a primeira onda de agregação plaquetária quando utilizadas na concentração de 500 µM (Figuras 15, 17 e 19), tornando difícil fazer inferências sobre o possível mecanismo de ação. No entanto, quando analisadas as curvas em que os compostos foram utilizados em concentrações próximas das CI₅₀, percebe-se que todos inibiram parcialmente a segunda onda de agregação quando o ADP e a epinefrina foram utilizados como agonista, mas não

quando o colágeno foi empregado (Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21). A inibição consistente da segunda onda de agregação gerada pela adição de ADP e epinefrina sugere que o possível mecanismo de ação dos três cromenos esteja relacionado com o bloqueio da amplificação do sinal pró-agregante. Essa hipótese é fortalecida por estudos que apontam que indivíduos com deficiência congênita de secreção de grânulos ou do metabolismo do AA apresentam perfis hipoagregantes e com inibição da segunda onda nas agregações induzidas por ADP e epinefrina (DAWOOD et al., 2012; HARRISON et al., 2011).

Cada agonista desencadeia a ativação de vias de sinalização específicas nas plaquetas por meio de interações com diferentes receptores (Figura 3) (POLL; PARKER, 2020). Independentemente do receptor, considera-se que para que a agregação plaquetária ocorra adequadamente, é necessário que haja a ativação de vias mediadas tanto por proteína Gq, quanto por Gi (LEE; STEFANINI; BERGMEIER, 2019). O ADP, ao interagir com seus receptores específicos P2Y1 ou P2Y12, desencadeia a ativação por vias de sinalização que são intermediadas por proteínas Gq e Gi, respectivamente. A epinefrina, por sua vez, ativa as plaquetas por meio de seus receptores α_2 -adrenérgico acoplados à proteína Gi. As interações do ADP e da epinefrina com seus receptores acoplados à proteína Gi culminam na ativação plaquetária por meio da regulação negativa do AMPc. Ao reduzir a concentração citoplasmática do AMPc, esses agonistas são capazes de ativar pequenas quantidades da GpIIb/IIIa e gerar fracas agregações iniciais (primeira onda). Adicionalmente, a ativação dos receptores acoplados à proteína Gi também provoca a ativação da PLA2, o que leva à síntese do TxA2 pela ação de enzimas sobre prostaglandinas que são originadas a partir da fragmentação do ácido araquidônico via COX1 (BROOS et al., 2012; LEE; STEFANINI; BERGMEIER, 2019; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). Ao ser secretado pelas plaquetas, o TxA2 interage com seus receptores específicos (Tp α e Tp β) na superfície das plaquetas, esses receptores são acoplados a proteína Gq que é responsável pela ativação da via da PLC β 2. Essa via realiza um *feedback* positivo, aumentando a ativação plaquetária por incentivar a produção de mais TxA2 e por reforçar os processos de secreção plaquetária e de ativação da GpIIb/IIIa (CLEMETSON; CLEMETSON, 2019). A ligação do ADP ao receptor P2Y1 acoplado a proteína Gq também é capaz de desencadear a ativação da PLC β 2 e, conseqüentemente, amplificar o sinal pró-agregante pela produção de TxA2 e secreção de grânulos (RAND;

ISRAELS, 2018; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). As plaquetas não possuem receptores α_2 -adrenérgicos acoplados à proteína Gq, o que torna a epinefrina um agonista altamente dependente da produção de TxA₂ e secreção de ADP para ativar a proteína Gq e, conseqüentemente, gerar agregações completas (CLEMETSON; CLEMETSON, 2019).

O colágeno é capaz de ativar as plaquetas por pelo menos duas vias de sinalização distintas, uma dependente de secreção e outra não. Acredita-se que a seleção entre essas vias é dependente da concentração de colágeno usado para ativar as plaquetas. Segundo Cho e colaboradores (2003), a via dependente de secreção é preferida quando o colágeno encontra-se em baixa concentração (2,5 $\mu\text{g/mL}$ em 10^6 plaquetas/ mm^3). Essa via usa duas fosfolipases para causar agregação discernível, PLC γ 2 e a PLC β 2 (CHO et al., 2003). Nessa via, o colágeno interage com o seu receptor específico, a GpVI, que ativa a PLC γ 2. Esta, por sua vez, estimulará a produção de TxA₂ e a secreção de grânulos ricos em ADP. O ADP secretado liga-se ao receptor P2Y₁ acoplado à proteína Gq e, dessa forma, ativa a PLC β 2, responsável por amplificar o sinal pró-agregante iniciado pela PLC γ 2 e, conseqüentemente, por gerar uma extensa agregação plaquetária (ASLAM et al., 2013; MONTAGUE; ANDREWS; GARDINER, 2018). Cho e colaboradores (2003) demonstraram que, quando as plaquetas são estimuladas por altas concentrações de colágeno (50 $\mu\text{g/mL}$ em 10^6 plaquetas/ mm^3), ocorre uma ativação de GpIIb/IIIa e, por conseguinte, uma agregação plaquetária que é independente de PLC γ 2, proteína Gq, secreção de grânulos densos e da ativação do receptor de TxA₂. Essa via de ativação alternativa pode explicar porque portadores de deficiência congênita de secreção de grânulos ou do metabolismo do AA apresentam perfis heterogêneo de agregação com o colágeno, alguns apresentam ausência de agregação, enquanto outros são hipoagregantes ou normoagregantes (DAWOOD et al., 2012; HARRISON et al., 2011). No presente estudo, a concentração de colágeno empregada é considerada intermediária (2 $\mu\text{g/mL}$ em 250.000 plaquetas/ mm^3), o que pode estar favorecendo ambas as vias de ativação pelo colágeno. Dessa forma, é possível que, apesar dos cromenos estarem inibindo as vias de amplificação de sinal (secreção de grânulos ou metabolismo do AA), o colágeno seria capaz de estimular as plaquetas a agregarem normalmente na presença de concentrações menores dos compostos, o que explicaria o comportamento das curvas de agregação obtidas quando o PRP foi estimulado pelo colágeno.

Mazzei e colaboradores (1988) investigaram o mecanismo de ação de uma série de cromenos e propuseram que a atividade antiagregante apresentada pelos compostos estava atrelada à inibição da via do TxA₂. Dessa forma, é possível propor que os cromenos avaliados no presente estudo também atuem inibindo essa via e não a secreção de grânulos.

Normalmente, não é esperado que haja diferença no mecanismo de ação entre compostos de uma mesma série que possuem estruturas químicas muito semelhantes entre si. Dessa forma, não seria, a priori, esperado que os mecanismos de ação do SEM **39**, **40** e **42** fossem distintos. Contudo, não se pode deixar de constatar que o SEM **39** demonstrou algumas características particulares, como CI₅₀ para ADP e epinefrina muito diferentes entre si e a incapacidade de inibir fortemente a primeira onda de agregação induzida por ADP. Interessantemente, o SEM **39** permitiu que a primeira onda de agregação se desenvolvesse de maneira instável, de forma que houve reversão da curva formada após alguns minutos de agregação.

Como mencionado, o ADP inicia a agregação pela ativação de seus receptores específicos P2Y₁ ou P2Y₁₂ (BROOS et al., 2012; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). A ativação do P2Y₁ acoplado à proteína G_q causa rápida mobilização de Ca²⁺, o que resulta em agregação plaquetária reversível. Para que a agregação plaquetária promovida pelo ADP seja irreversível, é necessário que ele se ligue ao receptor P2Y₁₂ acoplado à proteína G_i (ASLAM et al., 2013). Portadores de deficiência congênita do receptor P2Y₁₂ apresentam uma curva de agregação com ADP muito similar (CATTANEO, 2019b; DAWOOD et al., 2012) à obtida neste trabalho quando o PRP foi incubado com SEM **39** em elevada concentração. No entanto, na deficiência de P2Y₁₂, não é esperado que a agregação induzida por epinefrina apresente inibição da primeira onda de agregação uma vez que a ligação da epinefrina ao seu receptor promoveria a ativação da via da proteína G_i no lugar do P2Y₁₂ (CATTANEO, 2019b; DAWOOD et al., 2012). Dessa forma, é pouco provável que o mecanismo de ação do SEM **39** seja pela inibição do P2Y₁₂, tendo em vista que a primeira onda de agregação foi quase que totalmente inibida pelo SEM **39** na estimulação com epinefrina.

Um padrão de inibição semelhante ao expresso pelo SEM **39** é encontrado em pessoas com deficiência congênita da proteína G_i. Esses indivíduos além de apresentarem agregações reversíveis com ADP e ausência de agregação com epinefrina, têm resposta heterogênea ao colágeno (DAWOOD et al., 2012). Nesse contexto, é

possível que o SEM **39** esteja agindo por um mecanismo distinto do SEM **40** e **42**, ou seja, ele pode estar inibindo a via da Gi e não a secreção de grânulos ou de TxA2.

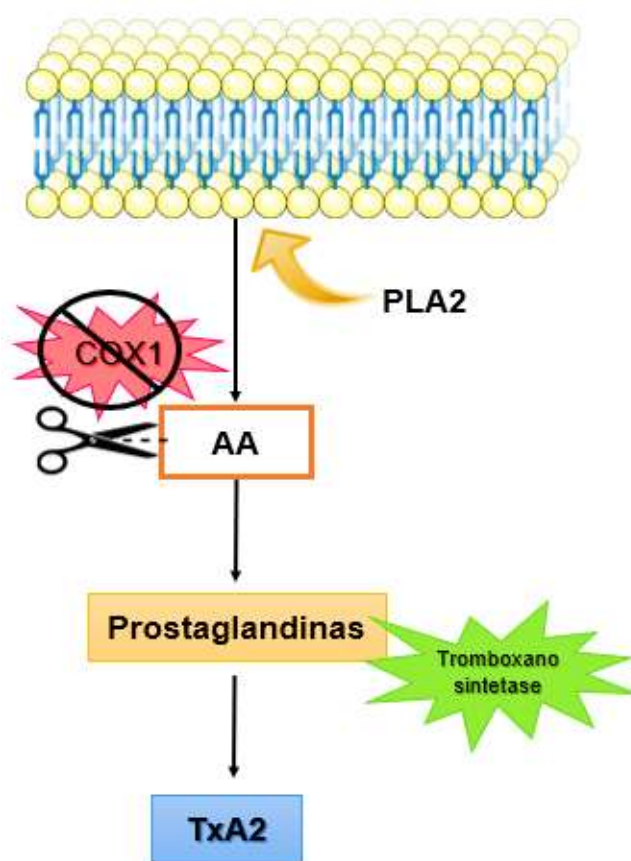
Para investigar a hipótese de que os três cromenos estariam interferindo na ativação plaquetária e, conseqüentemente, na ativação da GpIIb/IIIa, realizou-se a avaliação da expressão de P-selectina e PAC-1 por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Tabela 7 e na Figura 22, os três compostos diminuíram expressivamente a expressão da GpIIb/IIIa ativada, demonstrando que os compostos inibem a agregação plaquetária ao diminuir a ativação do principal receptor envolvido na ligação plaqueta-plaqueta (AUSTIN, 2017).

Os compostos SEM **40** e **42** diminuíram fracamente a expressão de P-selectina, sugerindo que o seu mecanismo de ação não esteja fortemente relacionado com a inibição da secreção de grânulos α . Ressalta-se que este ensaio não permite determinar se os compostos interferem na secreção de grânulos densos, por isso, não é possível inferir que os compostos não interferem de forma significativa na secreção de todos os grânulos plaquetários. Diferentemente dos outros compostos, o SEM **39** reduziu em quase 50% a expressão de P-selectina. Essa diferença mais uma vez reforça a hipótese de que ele possa estar agindo por outro mecanismo, no caso, pela inibição da via da Gi. Nos ensaios de citometria de fluxo, foi utilizada a epinefrina como agonista. A epinefrina não é capaz de por si só levar à secreção de grânulos, uma vez que esse evento é desencadeado pela proteína Gq. Dessa forma, ela depende da ativação de Gi para que o TxA2 seja produzido e se ligue aos seus receptores acoplados à Gq e, assim, ocorrer a secreção dos grânulos (BROOS et al., 2012). Portanto, essa elevada inibição da expressão de P-selectina está em consonância com a hipótese de inibição da via da Gi.

Para auxiliar a elucidar os mecanismos de ação do SEM **39**, **40** e **42**, realizou-se um ensaio de agregação com AA. O AA é um ácido graxo insaturado precursor do TxA2 que é incapaz de ativar as plaquetas. Para que o AA ative e gere agregação plaquetária, a COX1 plaquetária necessita incorporar duas moléculas de oxigênio à sua estrutura, formando prostaglandinas que, ao sofrerem a ação da tromboxano sintetase, originarão TxA2, um agonista de menor duração que é capaz de ativar e gerar agregação plaquetária (GROSSER; FRIES; FITZGERALD, 2007; TROSTCHANSKY; MOORE-CARRASCO; FUENTES, 2019). Ao ser secretado, o TxA2 aumenta a expressão de receptores de fibrinogênio (GpIIb/IIIa) bem como interage com seus receptores

específicos (TP α e TP β) de superfície plaquetária. Como anteriormente mencionado, a interação do TxA₂ com seus receptores acoplados à proteína G α ativa a PLC β 2 e, conseqüentemente, suas vias de sinalização, culminando na secreção de grânulos, na mudança conformacional da plaqueta e na ativação da GpIIb/IIIa (BROOS et al., 2012; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). Portanto, a agregação com AA auxilia a compreender o mecanismo de ação dos compostos, uma vez que a agregação com AA não é afetada ou quase não é afetada pela deficiência de secreção de grânulos ou pela deficiência de G α i, mas é fortemente influenciada pela inibição do metabolismo do AA, uma vez que não haverá a formação do TxA₂ (Figura 23), o verdadeiro ativador da plaqueta nesse modelo (BROOS et al., 2012).

Figura 23 - Metabolismo do ácido araquidônico



PLA2 - Fosfolipase A2; COX1 - Ciclooxigenase 1; AA - Ácido araquidônico; TxA₂ - tromboxano A₂.
Fonte: A autora.

Como observado na Figura 22, o SEM **39**, **40** e **42** inibiram completamente a agregação estimulada por AA, mesmo quando empregados em uma concentração inferior as CI_{50} obtidas para os outros agonistas ($31,2 \mu\text{M}$) é possível sugerir o efeito antiagregante do SEM **39**, **40** e **42** está intimamente relacionado a um bloqueio do metabolismo do AA e, conseqüentemente, da produção do TxA₂. Mais estudos serão necessários para uma confirmação desse mecanismo e para estabelecer se os cromenos são inibidores da COX1 ou da tromboxano A₂ sintetase. No entanto, é importante ressaltar que fármacos com mecanismos de ação semelhante (por exemplo o AAS) são amplamente utilizados na prática clínica médica moderna (GRASSI; DO CARMO ARAÚJO, 2012), o que reforça que os cromenos SEM **39**, **40** e **42** podem ser considerados interessantes compostos-protótipos de fármacos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no presente estudo permitem concluir que:

- As duas séries de compostos sintéticos, piranocumarinas e cromenos e a molécula precursora SEM 19 inibem significativamente a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas;
- Nenhuma piranocumarina testadas exerce efeito sobre a coagulação sanguínea;
- O cromeno SEM 37 e a substância precursora SEM 19 prolongaram significativamente o TP, porém, este prolongamento não tem relevância clínica aplicável;
- Os cromenos SEM 40, 42 e a substância precursora SEM 19 prolongaram o TTPa, mas não causaram alteração clinicamente significativa da relação do TTPa;
- Os estudos *in silico* demonstraram que os cromenos apresentam menor probabilidade teórica de desenvolver eventos de toxicidade quando comparados com as piranocumarinas;
- Cromenos SEM 39, 40 e 42 foram considerados os compostos mais promissores e os mesmos não alteraram a viabilidade plaquetária;
- As melhores CI_{50} foram obtidas pelo estímulo com epinefrina;
- Os cromenos selecionados apresentaram efeito dependente da concentração, mas sua atividade sofre interferências com maior tempo de incubação;
- Os perfis das curvas de agregação sugerem que o provável mecanismo de ação dos três compostos é pela inibição da via do TxA_2 ;
- Os três compostos inibiram significativamente a expressão da GpIIb/IIIa ativada;
- SEM 39 inibiu de maneira mais acentuada a expressão da P-selectina quando comparado com SEM 40 e 42;
- Os três compostos selecionados reduziram de maneira efetiva a ativação das plaquetas quando estimuladas por AA em uma concentração menor que a CI_{50} .

Diante dos dados apresentados no presente estudo, é possível concluir que os compostos SEM 39, 40 e 42 podem ser utilizados como possíveis protótipos para novos fármacos antiagregantes, uma vez que seu provável mecanismo de ação está relacionado a uma importante via de ativação dos processos de agregação plaquetária.

8 PERPECTIVAS

- Realização estudos de modelagem molecular para avaliar *in silico* as possibilidades de o mecanismo de ação do SEM **39**, **40** e **42** estar relacionado a inibição da COX1 ou da tromboxano sintetase;
- Avaliar se o SEM **39**, **40** e **42** interferem na secreção dos grânulos densos;
- Avaliar o efeito dos três cromenos em modelos de trombose *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AIDA, Y. et al. The antagonistic effects of khellactones on platelet-activating factor, histamine, and leukotriene D4. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 859-867, 1995.

ALLFORD, S. L.; MACHIN, S. Haemostasis. **Medicine**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.11-14, 2004.

ANGIOLILLO, D. J.; FERREIRO, J. L. Platelet Adenosine Diphosphate P2Y12 Receptor Antagonism: Benefits and Limitations of Current Treatment Strategies and Future Directions. **Rev Esp Cardiol.**, v. 63, n. 1, p. 60-76, 2010.

ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; PAULA, E. V. Blood Coagulation and Endothelium. **Endothelium and Cardiovascular Diseases**, [s.l.], p. 147-152, 2018.

ARAÚJO, A. C. O.; DOMINGUES, R. B.; VAN BELLEN, B. Comparison between the conventional method and a portable device for determination of INR. **Jornal Vascular Brasileiro**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 88-93, 2014.

ASLAM, M. et al. Nucleoside triphosphates inhibit ADP, collagen, and epinephrine-induced platelet aggregation: Role of P2Y1 and P2Y12 receptors. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 132, n. 5, p. 548-557, 2013.

AUSTIN, S. K. Haemostasis. **Medicine**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 204-208, abr. 2017.

BADE, R.; CHAN, H.; REYNISSON, J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 5646-5652, 2010.

BANE JR, C. E.; GAILANI, D. Factor XI as a target for antithrombotic therapy. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1454-1458, 2014.

BARDDAL, H. P. O. et al. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 145, p. 604-610, 2020.

BEKELIS, K. et al. Direct oral anticoagulant and antiplatelet combination therapy: Hemorrhagic events in coronary artery stent recipients. **Journal of Clinical Neuroscience**, [s.l.], v. 50, p. 24-29, 2018.

BERENBAUM, M. R. Coumarins. **Herbivores: their Interactions with Secondary Plant Metabolites**, [s.l.], p. 221-249, 1991.

BERNARDI, P. S. M.; MOREIRA, H. W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 239-244, 2004.

BHAGAVAN, N. V.; HA, C. Biochemistry of Hemostasis. **Essentials of Medical Biochemistry**, [s.l.], p. 473-486, 2011.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.

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

BOTELHO, S. F.; MARTINS, M. A. P.; REIS, A. M. M. Análise de medicamentos novos registrados no Brasil na perspectiva do Sistema Único de Saúde e da carga de doença. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 215-228, 2018.

BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 155-167, 2011.

BROOS, K. et al. Blood platelet biochemistry. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 129, n. 3, p. 245-249, 2012.

BROUSSALIS, Erasmia et al. Latest developments in anticoagulant drug discovery. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 19, n. 7, p. 921-935, jul. 2014.

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

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, [s.l.], v. 248, p. 97-109, 2016.

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

CALDEIRA, D.; PEREIRA, H. Adjuvant antithrombotic therapy in ST-elevation myocardial infarction: A narrative review. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 289-297, 2019.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CANDIA, E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 129, n. 3, p. 250-256, 2012.

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

CATTANEO, M. The Platelet P2 Receptors. **Platelets**, [s.l.], p. 259-277, 2019a.

CATTANEO, M. P2Y12 Antagonists. **Platelets**, [s.l.], p. 937-956, 2019b.

CHAN, L. Li-Ying; RICE, W. L.; QIU, J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. **Plos One**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 1-17, 2020.

CHANG, H. et al. Agonist and antagonist effects of diadenosine tetraphosphate, a platelet dense granule constituent, on platelet P2Y1, P2Y12 and P2X1 receptors. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 125, n. 2, p. 159-165, 2010.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 17-24, jan. 2015.

CHO, M. J. et al. The roles of α IIB β 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A2, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. **Blood**, [S.L.], v. 101, n. 7, p. 2646-2651, 2003.

CLARK, D.; PICKETT, S. D. Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 49-58, 2000.

CLEMETSON, K. J. Platelets and Primary Haemostasis. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 129, n. 3, p. 220-224, 2012.

CLEMETSON, K. J.; CLEMETSON, J. M. Platelet Receptors. **Platelets**, [s.l.], p.169-192, 2019.

COSTA, M. et al. Biological importance of structurally diversified chromenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 123, p. 487-507, 2016.

COX, Dermot. Anti-platelet agents: past, present and future. **Isbt Science Series**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 131-141, 6 out. 2019.

CRISWELL, K. Evaluation of Hemostasis. **Comprehensive Toxicology**, [s.l.], p. 477-497, 2018.

DASH, A. K. et al. Green chemistry appended synthesis, metabolic stability and pharmacokinetic assessment of medicinally important chromene dihydropyrimidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**, v. 29, n. 24, p. 126750, 2019.

DAWOOD, Ban B. *et al.* Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. **Blood**, [S.L.], v. 120, n. 25, p. 5041-5049, 13 dez. 2012.

DINPARAST, L. et al. An efficient, catalyst-free, one-pot synthesis of 4H-chromene derivatives and investigating their biological activities and mode of interactions using molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1203, p. 127426, 2020.

DOBESH, P. P.; STACY, Z.A. Pharmacology of Oral Anticoagulants. **Stroke Prevention in Atrial Fibrillation**, [s.l.], p. 11-34, 2019.

DORNBOS, D.; NIMJEE, S. M. Reversal of Systemic Anticoagulants and Antiplatelet Therapeutics. **Neurosurgery Clinics of North America**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 537-545, 2018.

FERNANDES, C. J. C. S. et al. New anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 146-154, 2016.

FLAUMENHAFT, R.; SHARDA, A. Platelet Secretion. **Platelets**, [s.l.], p. 349-370, 2019.

FLAUMENHAFT, R. Platelet Secretion. **Platelets**, [s.l.], p. 343-366, 2013.

FREDENBURGH, J. C.; WEITZ, J. I. Overview of Hemostasis and Thrombosis. **Hematology**, [s.l.], p. 1831-1842, 2018.

FRYDMAN, G. H.; PATE, K.; VITSKY, A. Platelets and Hemostasis. In: **Hematopoietic System Toxicology**, p. 61-113, 2017.

GALE, A. J. Continuing education course# 2: current understanding of hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 1, p. 273-280, 2011.

GASECKA, A. et al. Switching between P2Y12 antagonists – From bench to bedside. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 115, p. 1-12, 2019.

GASPAR, A. et al. Chromone: a valid scaffold in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 9, p. 4960-4992, 2014.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 153-162, 2015.

GRASSI, E. A.; ARAÚJO, M.C. Antiagregantes plaquetários: ampliando conhecimento. **Disciplinarum Scientia, série Ciência da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 131-143, 2012.

GREEN, D. Anticoagulant heparins. **The Heparins**, [s.l.], p. 3-33, 2020.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G., A. Thromboxane Generation. **Platelets**, [s.l.], p. 565-574, 2007.

GUIDO, R.V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, B.; GONÇALVES, L. R.; MANSILHA, A. Anticoagulantes orais diretos: um novo paradigma no tratamento da trombose venosa profunda. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v. 13, n. 2, p. 62-81, 2017.

HALKAR, M; LINCOFF, A. M. Dual antiplatelet therapy for acute coronary syndromes: How long to continue?. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 83, n. 9, p. 675-688, 2016.

HAO, C. et al. Low molecular weight heparins and their clinical applications. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, [s.l.], p. 21-39, 2019.

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

HARTWIG, J. H. The Platelet Cytoskeleton. **Platelets**, [s.l.], p. 145-168, 2013.

HAYWARD, C. P.M.; MOFFAT, Karen A. Platelet Aggregation. **Platelets**, [s.l.], p. 609-626, 2019.

HESSLER, Gerhard; BARINGHAUS, Karl-Heinz. Artificial Intelligence in Drug Design. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 2520, 2 out. 2018.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. Fundamentos em hematologia. In: **Fundamentos em Hematologia**. 2013. p. 315.

HOFFMAN, M. Regulation of Hemostasis and Thrombosis. In: **Cardiac Intensive Care**, p. 81-89, 2019.

HUNT, B. **World Thrombosis Day**. 2020. International Society on Thrombosis and Haemostasis. Disponível em: <https://www.worldthrombosisday.org/issue/thrombosis/>. Acesso em: 17 abr. 2020.

JOBLING, L.; EYRE, L. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 51-53, 2013.

KALATHOTTUKAREN, M. T.; KIZHAKKEDATHU, J. N. Mechanisms of blood coagulation in response to biomaterials: Extrinsic factors. **Hemocompatibility Of Biomaterials for Clinical Applications**, [s.l.], p. 29-49, 2018.

KANNAN, M.; AHMAD, F.; SAXENA, R. Platelet activation markers in evaluation of thrombotic risk factors in various clinical settings. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 37, p. 1-9, 2019.

KAZIMIERCZYK, R. et al. The significance of diminished sTWEAK and P-selectin content in platelets of patients with pulmonary arterial hypertension. **Cytokine**, [s.l.], v. 107, p. 52-58, 2018.

KERI, R., S. et al. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 78, p. 340-374, 2014.

KOENIG-OBERHUBER, V.; FILIPOVIC, M. New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants. **British Journal of Anaesthesia**, [s.l.], v. 117, p. 74-84, 2016.

KOESSLER, J. et al. The role of agonist-induced activation and inhibition for the regulation of purinergic receptor expression in human platelets. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 168, p. 40-46, 2018.

KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 365-374, 2006.

KUMAR, A. et al. Pyranocoumarins: a new class of anti-hyperglycemic and anti-dyslipidemic agents: A new class of anti-hyperglycemic and anti-dyslipidemic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 19, n. 22, p. 6447-6451, 2009.

KUNADIAN, V. et al. Aspirin, Platelet P2Y₁₂ Receptor Inhibitors, and Other Oral Antiplatelets. **Interventional Cardiology Clinics**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 527-535, 2013.

LECOVER, R. et al. Kinetic Modeling of Coagulation and Fibrinolysis. **IFAC-PapersOnLine**, [s.l.], v. 52, n. 26, p. 94-100, 2019.

LEE, R. H.; STEFANINI, L.; BERGMEIER, W. Platelet Signal. Transduction. **Platelets**, [s.l.], p. 329-348, 2019.

LEONARDI, M. J. Laboratory Evaluation of Hemostasis Disorders. **Physician Assistant Clinics**, v. 4, n. 3, p. 609, 2019.

LI, R. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. **Platelets**, [s.l.], p. 193-211, 2019.

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.

LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 64, p. 4-17, 2012.

LORGA FILHO, A. M. et al. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 3, p. 1-95, 2013.

LU, Q.; MALINAUSKAS, R. A. Comparison of Two Platelet Activation Markers Using Flow Cytometry After In Vitro Shear Stress Exposure of Whole Human Blood. **Artificial Organs**, [S.L.], p. 01-12, 2010.

MANCUSO, M. E.; SANTAGOSTINO, E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. **British Journal of Haematology**, [s.l.], v. 178, n. 2, p. 209-219, 2017.

MAHTTA, D.; BAVRY, A. A. α Ib β 3 (GPIIb-IIIa) Antagonists. **Platelets**, [s.l.], p. 957-971, 2019.

MARTIN, E. F. et al. Prospecting for cytotoxic and antiprotozoal 4-aryl-4H-chromenes and 10-aryldihydropyrano[2,3-f] chromenes. **Archiv der Pharmazie**, [s.l.], v. 351, n. 10, p. 1800100, 2018.

MAZZEI, M. et al. Synthesis and anti-platelet activity of some 2-(dialkylamino)chromones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 237-242, 1988.

MAZZEI, M. et al. Synthesis and antiplatelet activity of 2-(diethylamino)-7-ethoxychromone and related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 7, p. 617-622, 1990.

MERCER, P. F.; CHAMBERS, R. C. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis of Disease**, [s.l.], v. 1832, n. 7, p. 1018-1027, 2013.

MILLER, Connie H. Platelet Aggregation Studies. **Transfusion Medicine and Hemostasis**, [S.L.], p. 827-831, 2019.

MISHRA, S.; PANDEY, A.; MANVATI, S. Coumarin: An emerging antiviral agent. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03217, 2020.

MONTAGNER, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/89992>. Acesso em: 17 abr. 2020.

MONTAGUE, S. J.; ANDREWS, R., K.; GARDINER, E., E. Mechanisms of receptor shedding in platelets. **Blood**, [s.l.], v. 132, n. 24, p. 2535-2545, 2018.

MOREL, A. et al. Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 430, n. 1-2, p. 69-80, 2017.

MUTCH, N. J. Regulation of Fibrinolysis by Platelets. **Platelets**, [s.l.], p. 417-431, 2019.

MYERS, D. et al. A new way to treat proximal deep venous thrombosis using E-selectin inhibition. **Journal Of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 268-278, 2020.

NAGY J. B.; DEBRECENI, I. B; KAPPELMAYER, J. Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers, v. 23, n. 4, p. 124, 2013.

NAKAMURA, T. et al. Signal transduction system in epinephrine stimulated platelets; comparison between epinephrine sensitive and insensitive platelets. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 85, n. 2, p. 83-93, 1997.

NORRIS, L. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 369-383, 2003.

OLAS, B.; BRYŚ, M. Effects of coffee, energy drinks and their components on hemostasis: the hypothetical mechanisms of their action: The hypothetical mechanisms of their action. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 127, p. 31-41, 2019.

OLIVEIRA, S. G. et al. Doenças do aparelho circulatório no Brasil de acordo com dados do Datasus: um estudo no período de 2013 a 2018. **Brazilian Journal of Health Review**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 832-846, 2020.

OURY, C. et al. Purinergic control of inflammation and thrombosis: role of P2X1 receptors. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 13, p. 106-110, 2015.

OVERBEY, D. M.; JONES, E. L.; ROBINSON, T. N. How hemostatic agents interact with the coagulation cascade. **AORN journal**, v. 100, n. 2, p. 148-159, 2014.

PATRONO, Carlo. Aspirin. **Platelets**, [s.l.], p. 921-936, 2019.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, v.1, n.18, p. 3-22, 2003.

PANICCIA, R. et al. Platelet function tests: a comparative review. **Vascular health and risk management**, v. 11, p. 133, 2015.

PFEFFERKORN, J. A. et al. P2Y1 receptor antagonists as novel antithrombotic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 3338-3343, 2008.

POLL, T. D. V.; PARKER, R. I. Platelet Activation and Endothelial Cell Dysfunction. **Critical Care Clinics**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 233-253, abr. 2020.

QUEIROZ, M. R. et al. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. **Toxicon**, [s.l.], v. 133, p. 33-47, 2017.

RAND, M. L.; ISRAELS, S.J. Molecular Basis of Platelet Function. **Hematology**, [S.L.], p. 1870-1884, 2018.

REVANKAR, H. M. et al. Coumarins scaffolds as COX inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 71, p. 146-159, abr. 2017.

ROGERS, H. J.; NAKASHIMA, M. O.; KOTTKE-MARCHANT, Kandice. Hemostasis and Thrombosis. In: **Hematopathology**, p. 57-105, 2018.

ROSA, R.; SCHENKEL, E. P.; BERNARDES, L. S. C. Semisynthetic and newly designed derivatives based on natural chemical scaffolds: moving beyond natural products to fight *Trypanosoma cruzi*. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 105-122, 2020.

ROYSTON, D. Anticoagulant and Antiplatelet Therapy. **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**, [s.l.], p. 870-894, 2019.

SANDHU, S. et al. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, n. 15, p. 3806-3814, 2014.

SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SCHNEIDER, G. Automating drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 97-113, 2017.

SCHULMAN, S.; FURIE, B. The Molecular Basis of Blood Coagulation. **Comprehensive Toxicology**, [s.l.], p. 114-129, 2018.

SEPÚLVEDA, C.; PALOMO, I.; FUENTES, E. Primary and secondary haemostasis changes related to aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s.l.], v. 150, p. 46-54, 2015.

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

SHIKDAR, S.; BHATTACHARYA, P. T. **International Normalized Ratio (INR)**. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507707/>.

SILVA, D. R. C. **Síntese e avaliação da atividade antiinflamatória e antimicrobiana de derivados 5,7-diidroxicumarina**. 2012. 160 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências e Tecnologia, Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012. Disponível em: http://ead.uenf.br/moodle/pluginfile.php/9735/mod_resource/content/1/Diego%20Range%20Cardoso%20Silva.pdf. Acesso em: 20 abr. 2020.

SIRA, J.; EYRE, L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 79-82, 2016.

SMITH, S. A.; MORRISSEY, J. H. Interactions Between Platelets and the Coagulation System. **Platelets**, [s.l.], p. 393-400, 2019.

SON, Y. et al. The inhibitory activity of ginsenoside Rp4 in adenosine diphosphate-induced platelet aggregation. **Journal of Ginseng Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 96-102, 2017.

SOUZA, L. G.; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 254, p.11-23, 2016.

STAVROU, E. X.; SCHMAIER, A. H. Venous and Arterial Thrombosis. **Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease**, [s.l.], p. 277-296, 2014.

STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, [S.L.], v. 111, n. 1, p. 111-113, 2015.

THOMAS, C. et al. Vitamin K antagonist rodenticides display different teratogenic activity. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 93, p. 131-136, 2020.

THOMAS, N.; ZACHARIAH, S. M. Pharmacological activities of chromene derivatives: an overview. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 6, n. 2, p. 11-15, 2013.

THOMAS, S. G. The Structure of Resting and Activated Platelets. **Platelets**, [s.l.], p. 47-77, 2019.

TOMAIUOLO, M.; BRASS, L.F.; STALKER, T. J. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis. **Interventional cardiology clinics**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

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

TROSTCHANSKY, A.; MOORE-CARRASCO, R.; FUENTES, E. Oxidative pathways of arachidonic acid as targets for regulation of platelet activation. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s.l.], v. 145, p. 106382, 2019.

TSAI, I. et al. Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1377-1382, 1998.

ULRICH-MERZENICH, G. S. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products—Potential and challenges for drug development. **Synergy**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 59-69, 2014.

VAN VELZEN, Jeroen F. et al. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 130, n. 1, p. 92-98, jul. 2012.

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

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p. 1-14, 2013.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 326-337, abr. 2006.

VILAHUR, G. et al. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 111, p. 22-25, 2018.

VON KÜGELGEN, I. Pharmacology of P2Y receptors. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 151, p. 12-24, 2019.

WAHED, A.; QUESADA, A.; DASGUPTA, A. Essentials of coagulation. **Hematology and Coagulation**, [s.l.], p. 237-264, 2020.

WALLER, D. G.; SAMPSON, A. P. Haemostasis. **Medical Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], p. 175-190, 2018.

WANG, B.; YANG, Z.; LI, T. Synthesis, characterization, and DNA-binding properties of the Ln (III) complexes with 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde-(2'-hydroxy) benzoyl hydrazone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 17, p. 6012-6021, 2006.

WOULFE, D. S. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. **Journal Of Thrombosis and Haemostasis**, [s.l.], v. 3, n. 10, p. 2193-2200, 2005.

WYSOKINSKI, W. E. et al. Association between P-selectin levels and left atrial blood stasis in patients with nonvalvular atrial fibrillation. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 172, p. 4-8, 2018.

XIA, H. et al. Hepatoprotective pyranocoumarins from the stems of *Clausena emarginata*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 130, p. 238-243, 2016.

XIANG, Qian et al. Progress in the development of antiplatelet agents: focus on the targeted molecular pathway from bench to clinic. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 203, p. 107393, 2019.

YAN, Y. et al. Contact activation by the intrinsic pathway of blood plasma coagulation. **Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications**, [s.l.], p. 3-28, 2018.

YOSHIDA, W. B. Anticoagulantes orais diretos no tratamento do tromboembolismo venoso em pacientes com câncer. **Jornal Vascular Brasileiro**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 263-264, 2016.

ZAIDI, A.; GREEN, L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 152-158, 2019.

ZGHAB, I. et al. Regiospecific synthesis, antibacterial and anticoagulant activities of novel isoxazoline chromene derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 10, p. s2651- s2658, 2017.

ZHAN, C. et al. Molecular modeling of purinergic receptor P2Y12 and interaction with its antagonists. **Journal Of Molecular Graphics and Modelling**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 20-31, 2007.

ZHOU, L.; SCHMAIER, A. H. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 123, n. 2, p. 172-183, 2005.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito de compostos naturais sobre a hemostasia humana

Pesquisador: Ana Carolina Rabello de Moraes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12353019.0.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.433.945

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa de Ana Carolina Rabello de Moraes, docente do Departamento de Análises Clínicas, com a participação de Carine Bollis Frozza, Bianca Regina Alberton, Iara Kretzer, Bruna Jaques, Tanara Arenhart e Stephanie Viegas Gikionis.

Trata-se de um estudo quantitativo e transversal, com previsão de 900 participantes, que utilizará amostras de sangue total de indivíduos referenciados à Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH. A amostra para a pesquisa é sangue total anticoagulado com citrato de sódio 3,2% ou EDTA, o qual será coletado no mesmo momento da coleta de amostra para a realização de outros exames laboratoriais, evitando uma segunda punção venosa. As amostras acondicionadas serão transportadas até o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) localizado no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH, onde serão processadas para a realização dos ensaios biológicos, como estudos de agregação plaquetária, de coagulação sanguínea, de western blot, de citometria de fluxo, de citotoxicidade, entre outros. As metodologias empregadas em cada um destes estudos constam do projeto anexado.

São critérios de inclusão:

- Indivíduos com idade superior a 18 anos, que procuraram a Unidade de Laboratório de Análises

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Retórica II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-8004 E-mail: cep.propesq@comitae.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.433.945

Clinicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HUI/UFSC/EBSERH para realizar exames laboratoriais;

- Individuos que não tenham utilizado antiagregantes, anticoagulantes ou anti-inflamatórios não esteroidais nos últimos 10 dias;
- Individuos que não tenham histórico de doença hepática;
- Individuos que tenham concordado em participar do estudo por meio da assinatura do TCLE. A hipótese é que os compostos naturais testados nas suas diferentes formas apresentam atividade antiagregante e/ou anticoagulante. Como desfecho primário, a pesquisadora cita a identificação de novos compostos de origem natural com atividade sobre a hemostasia humana.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar estudos sistemáticos para avaliar os efeitos de compostos de origem natural, na forma de extrato

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São citados os riscos relativos aos procedimentos de coleta de sangue (formação de hematoma e dor), possíveis constrangimentos durante a explicação do projeto e/ou quebra de confidencialidade dos dados coletados. São descritos os procedimentos para reduzir os riscos.

Não haverá benefícios diretos. São citado como benefício indireto a possibilidade de serem identificados novos compostos de origem natural com propriedades terapêuticas e que representem um avanço em direção ao desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta pertinência, fundamentação bibliográfica, clareza em seus objetivos e potencial para contribuir com a linha de pesquisa que se encaixa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto vem assinada pela pesquisadora responsável e pela autoridade institucional competente (Chefe do Departamento de Análises Clínicas).

Consta declaração da instituição onde será realizada a pesquisa (HUI/UFSC), assinada por responsável institucional, disponibilizando a existência de infraestrutura necessária ao

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Ulysses Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-6004 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.433.945

desenvolvimento da pesquisa, autorizando a sua execução e comprometendo-se a cumprir os
O cronograma informa que a coleta de dados acontecerá a partir de 22/07/2019.
O orçamento informa despesas de R\$ 13.500,00 com financiamento próprio.
O TCLE está claro quanto a objetivos, procedimentos e riscos e cumpre essencialmente todas as exigências da res. 466/12.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1337608.pdf	03/06/2019 13:48:01		Acelto
Outros	hemostasia_carta_de_resposta_ao_CEP_SH_28052019.pdf	03/06/2019 13:46:24	Ana Carolina Rabello de Moraes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_hemostasia_produtos_naturais_2v_28052019.pdf	03/06/2019 13:45:17	Ana Carolina Rabello de Moraes	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_comite_etica_hemostasia_produtos_naturais_2v.pdf	03/06/2019 13:44:50	Ana Carolina Rabello de Moraes	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	16/04/2019 17:46:23	Ana Carolina Rabello de Moraes	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_concordancia_hu_16042019.pdf	16/04/2019 16:14:23	Ana Carolina Rabello de Moraes	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Mtor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-6064 E-mail: cep.propeq@contato.ufsc.br