



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

Fernanda Tondello Jacobsen

**Atividade antiagregante *in vitro* de análogos de dihidropiridinas**

Florianópolis

2022

Fernanda Tondello Jacobsen

**Atividade antiagregante *in vitro* de análogos de dihidropiridinas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de concentração Fármaco-Medicamentos  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.

Florianópolis

2022

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

Jacobsen, Fernanda Tondello Jacobsen

Atividade antiagregante in vitro de análogos de  
dihidropiridinas / Fernanda Tondello Jacobsen Jacobsen ;  
orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes , 2022.

63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. antiagregante, dihidropiridinas. I. ,  
Ana Carolina Rabello de Moraes. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.  
III. Título.

Fernanda Tondello Jacobsen

**Atividade antiagregante *in vitro* de análogo de dihidropiridinas**

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

Profa. Izabella Thais da Silva, Dra.

UFSC

Prof. Eduardo Benedetti Parisotto, Dr.

UFMS

Prof. Leonardo Garcia Velasquez, Dr.

UNIPAR

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. Thais Cristine Marques Sincero, Dra.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha irmã e aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Odete e Jucelino e à minha irmã Fabiana, meus maiores amores, que sempre acreditaram em mim e, que mesmo de longe, continuaram me apoiando e me dando força todos os dias, amo vocês.

Minha avó Amélia, pelo exemplo, carinho e apoio em todas as minhas decisões.

Minha orientadora Professora Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes, que sem me conhecer me acolheu com muito carinho desde o primeiro dia, me escutou, me apoiou e acreditou em mim. Agradeço a oportunidade de aprender contigo, de conhecer essa excelente profissional e pessoa de coração gigante.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de ler e avaliar meu trabalho.

Minhas amigas Tatiane e Angela, pelos conselhos, risadas e apoio há mais de dez anos, vocês são parte de quem eu sou.

Aos meus colegas Lucas, Carine e Stephanie, que me ensinaram muito durante toda essa etapa. Aos pós-graduandos do LOEH e do LAPEO pela ajuda, sempre que necessário. Com certeza a presença de vocês fez essa etapa ser melhor.

Minha companheira Caroline, por estar presente, me apoiar nas minhas escolhas e não me deixar esquecer do amor que tenho pelo que faço.

Todos os professores que me acompanharam desde a graduação, o exemplo de vocês me motiva a estar aqui hoje.

Ao doutorando Luis Pollo e seus orientadores por toda ajuda e disponibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e a CAPES pela concessão da bolsa.

A toda equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago pela ajuda e compreensão.

Sou grata a todos que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui.

## RESUMO

As doenças cardiovasculares são responsáveis por grande parte das mortes no mundo e os medicamentos antitrombóticos são os mais utilizados no seu tratamento e prevenção. Apesar de esses medicamentos terem comprovada efetividade, ainda apresentam limitações de uso, o que torna necessária a busca por novos agentes antitrombóticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de quinze dihidropiridinas (DHPs) sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea. Os testes *in silico* de biodisponibilidade oral e toxicidade realizados pelos programas SwissADME e *Osiris*<sup>®</sup> *Property Explorer* demonstraram que todas as DHPs apresentam promissora biodisponibilidade oral e baixa toxicidade teórica. O efeito antiagregante foi avaliado por agregometria, utilizando como agonistas difosfato de adenosina (ADP) e epinefrina, os compostos L-11, L-12, L-13, L-14, L-15, L-16, L-17, L-20, L-24, L-26, L-27, L-28 e L-29 inibiram significativamente a agregação induzida por pelo menos um dos agonistas. As DHPs N-feniladas (L-18 até L-29) apresentaram atividade antiagregante pouco promissora na triagem e, por isso, não foi dada continuidade nas investigações com esses compostos. Nenhuma das DHPs não N-feniladas (L-11 até L-17) apresentou promissora atividade anticoagulante segundo os testes de tempo de protrombina (TP) e de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Segundo o teste de viabilidade plaquetária, realizado pelo método de exclusão por azul de *Trypan*, três compostos não diminuíram significativamente a viabilidade das plaquetas, foram os composto L-11, L-14 e L-15 que apresentaram viabilidade de  $95,1 \pm 0,6\%$ ,  $94,4 \pm 0,2\%$  e  $94,2 \pm 1,6\%$ , respectivamente. Considerando os resultados dos testes de agregação e viabilidade plaquetária, o composto L-11 foi selecionado para dar continuidade aos estudos. As  $CI_{50}$  do composto L-11 utilizando-se ácido araquidônico, colágeno e epinefrina como agonistas foram de  $113,4 \pm 7,44 \mu\text{M}$ ,  $399,4 \pm 16,41 \mu\text{M}$  e  $334,1 \pm 15,74 \mu\text{M}$ , respectivamente. O composto L-11 inibiu a primeira e a segunda onda de agregação quando o ácido araquidônico foi empregado como agonista, e inibiu apenas parcialmente a segunda onda quando as plaquetas foram estimuladas com colágeno e epinefrina. Adicionalmente, L-11 diminuiu a expressão de P-selectina em 76,47% quando as plaquetas foram estimuladas com ácido araquidônico. A compilação dos resultados sugere que o possível mecanismo de ação do composto L-11 se dá pela inibição da via do ácido araquidônico.

**Palavras-chave:** Doenças cardiovasculares. Trombose. Plaquetas.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are responsible for most deaths in the world and antithrombotic drugs are the most used in their treatment and prevention. Although these drugs have proven effectiveness, they still have limitations in their use, which makes it necessary to search for new antithrombotic agents. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of fifteen dihydropyridines (DHPs) on platelet aggregation and blood clotting. *In silico* tests of oral bioavailability and toxicity performed by the SwissADME and Osiris® Property Explorer programs demonstrated that all DHPs show promising oral bioavailability and low theoretical toxicity. The antiplatelet effect was evaluated by aggregometry, using adenosine diphosphate (ADP) and epinephrine as agonists, and the compounds L-11, L-12, L-13, L-14, L-15, L-16, L-17, L-20, L-24, L-26, L-27, L-28 e L-29 significantly inhibited the aggregation induced by at least one of the agonists. N-phenylated DHPs (L-18 to L-29) showed unpromising antiplatelet activity in screening and, therefore, investigations with these compounds were not continued. None of the non-N-phenylated DHPs (L-11 to L-17) showed promising anticoagulant activity according to the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) tests. According to the platelet viability test, carried out by the Trypan blue exclusion method, three compounds did not significantly decrease platelet viability.  $95,1 \pm 0,6\%$ ,  $94,4 \pm 0,2\%$  and  $94,2 \pm 1,6\%$ , respectively. Considering the results of the platelet aggregation and viability tests, the compound L-11 was selected to continue the studies. The IC<sub>50</sub> of compound L-11 using arachidonic acid, collagen and epinephrine as agonists were  $113,4 \pm 7,44 \mu\text{M}$ ,  $399,4 \pm 16,41 \mu\text{M}$  and  $334,1 \pm 15,74 \mu\text{M}$ , respectively. Compound L-11 inhibited the first and second waves of aggregation when arachidonic acid was used as an agonist, and only partially inhibited the second wave when platelets were stimulated with collagen and epinephrine. Additionally, L-11 decreased P-selectin expression by 76.47% when platelets were stimulated with arachidonic acid. The compilation of the results suggests that the possible mechanism of action of the compound L-11 is due to the inhibition of the arachidonic acid pathway.

**Keywords:** Cardiovascular disease. Thrombosis. Platelets.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das plaquetas.....	21
Figura 2 – Interações receptor-ligante na adesão plaquetária.....	23
Figura 3 – Interações receptor-ligante na ativação plaquetária .....	24
Figura 4 – Interações entre plaquetas durante a agregação .....	26
Figura 5 – Representação esquemática da cascata de coagulação.....	27
Figura 6 – Estrutura química básica e substituintes das dihidropirinas.....	32
Figura 7 – Estrutura química básica e substituintes das dihidropiridinas N-feniladas.....	33
Figura 8 – Representação da curva de agregação plaquetária .....	35
Figura 9 – Efeito das dihidropiridinas (500 $\mu$ M) sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP 10 $\mu$ M) .....	42
Figura 10 – Efeito das dihidropiridinas (500 $\mu$ M) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina (EPI - 5 $\mu$ g/mL) .....	43
Figura 11 – Curvas de agregação plaquetária induzida por epinefrina, colágeno e ácido araquidônico em função de diferentes concentrações do L-11.....	46
Figura 12 – Perfil das curvas de agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico com diferentes concentrações do composto L-11 .....	47
Figura 13 – Perfil das curvas de agregação plaquetária induzida por colágeno com diferentes concentrações do composto L-11 .....	47
Figura 14 – Perfil das curvas de agregação plaquetária induzida por epinefrina com diferentes concentrações do composto L-11 .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros teóricos de biodisponibilidade oral das dohidropiridinas determinados pela ferramenta SwissADME .....	40
Tabela 2 – Parâmetros de toxicidade teórica das dihidropiridinas avaliados pelo software Osiris® Property Explorer.....	41
Tabela 3 – Efeitos das dihidropiridinas (500 µM) sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) .....	44
Tabela 4 – Efeito tóxico das dihidropiridinas (500 µM) sobre as plaquetas humanas.....	45
Tabela 5 – Efeito do composto L-11 (333,3 µM) sobre a agregação plaquetária em diferentes tempos de incubação (5 e 15 minutos) .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetil salicílico
ADP	Adenosina difosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
Ce	Controle com estímulo de agonista
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
COL	Colágeno
COX	Ciclooxigenase
Cse	Controle sem estímulo de agonista
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doença cardiovascular
DHP	Dihidropiridinas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EP	Erro Padrão
EPI	Epinefrina
Et	Etil
EUA	Estados Unidos da América
F	Fator
FSC	Forward scatter
FT	Fator tecidual
FvW	Fator de von Willebrand
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GP	Glicoproteína
HU	Hospital Universitário
IFM	Índice de fluorescência média
IM	Infarto do miocárdio
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
MCP1	Proteína quimioatrativa de monócitos-1

Me Metil  
NO Óxido nítrico  
PAR Receptor ativado por protease  
PBS Tampão fosfato-salino  
Ph Fenil  
PPGFar Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
PM Peso molecular  
PPP Plasma pobre em plaquetas  
PRP Plasma rico em plaquetas  
R Radical  
RNI Razão normalizada internacional  
ROS Espécies reativas de oxigênio  
SIB Instituto Suíço de Bioinformática  
SSC Side scatter  
TCLE Termo de Compromisso Livre e Esclarecido  
Te Teste com estímulo de agonistas  
TEV Tromboembolismo venoso  
TFPI Inibidor da via do fator tecidual  
TNF Fator de necrose tumoral  
TP Tempo de protrombina  
TPa Ativador de plasminogênio tecidual  
TPSA Área de superfície polar  
TT Tempo de tromboplastina  
TTPa Tempo de tromboplastina parcial ativada  
TxA2 Tromboxano A2  
UFSC Universidade Federal de Santa Catarina  
WHO World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
3.1	HEMOSTASIA .....	19
3.2	HEMOSTASIA PRIMÁRIA .....	19
3.2.1	Endotélio vascular .....	19
3.2.2	Plaquetas .....	20
3.2.3	Adesão plaquetária.....	22
3.2.4	Ativação plaquetária .....	23
3.2.5	Secreção plaquetária .....	25
3.2.6	Agregação plaquetária .....	26
3.3	HEMOSTASIA SECUNDÁRIA.....	27
3.3.1	CASCATA DA COAGULAÇÃO.....	27
3.4	FIBRINÓLISE .....	28
3.5	DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TRATAMENTO.....	28
3.6	COMPOSTOS SINTÉTICOS .....	29
3.6.1	Dihidropiridinas.....	30
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA E ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	31
4.2	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	31
4.3	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS.....	31
4.3.1	Solubilização dos compostos.....	33
4.4	ENSAIO TEÓRICO DE BIODISPONILIDADE ORAL.....	33

4.5	ENSAIO TEÓRICO DE TOXICIDADE .....	34
4.6	ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	34
4.7	ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	36
4.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE COM AZUL DE <i>TRYPAN</i> .....	36
4.9	DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DO COMPOSTO L-11 .....	37
4.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO L-11 EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INCUBAÇÃO .....	37
4.11	EXPRESSÃO MEMBRANAR DE P-SELECTINA .....	38
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1	BIODISPONIBILIDADE ORAL TEÓRICA DAS DHPS .....	40
5.2	TOXICIDADE TEÓRICA DAS DHPS .....	41
5.3	EFEITO DAS DHPS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	41
5.4	ATIVIDADE DAS DHPS SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	43
5.5	EFEITO DAS DHPs SOBRE A VIABILIDADE DAS PLAQUETAS HUMANAS.....	44
5.6	DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DO COMPOSTO L-11 UTILIZANDO EPINEFRINA, COLÁGENO E ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	45
5.6.1	Avaliação dos perfis das curvas de agregação em diferentes concentrações do composto L-11 .....	46
5.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO COMPOSTO L-11.....	48
5.8	EXPRESSÃO MEMBRANAR DE P-SELECTINA .....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ...</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Hemostasia é o processo que garante a manutenção do fluxo sanguíneo em condições fisiológicas normais e impede a perda significativa de sangue após a lesão vascular (DÁVILA SINAÍ DEL CARMEN *et al.*, 2019). Quando ocorre uma lesão em vaso sanguíneo, um mecanismo hemostático rápido e eficiente é essencial para retomar a integridade do vaso e o fluxo sanguíneo normal, por outro lado, esse mecanismo deve ser rigidamente controlado para evitar uma trombose patológica. Portanto, a hemostasia normal depende de um equilíbrio entre a trombose e a hemorragia, por meio de processos pró e antitrombóticos (ZAIDI; GREEN, 2019).

Didaticamente, a hemostasia é dividida em hemostasia primária, hemostasia secundária e hemostasia terciária ou fibrinólise (DÁVILA SINAÍ DEL CARMEN *et al.*, 2019). Na hemostasia primária, ocorrem os processos de vasoconstrição e formação do tampão plaquetário (RAUCH; PARIS, 2018). A hemostasia secundária, conhecida como cascata de coagulação, é a etapa em que acontecem interações com várias proteínas, com o objetivo de formar o coágulo de fibrina para estabilizar o tampão plaquetário (AUSTIN, 2017). A fibrinólise é o processo de remoção gradativa do coágulo de fibrina para restabelecer o fluxo sanguíneo (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2019).

Caso haja alguma desregulação nos processos da hemostasia, pode ocorrer a formação de um trombo indevido, fenômeno conhecido como trombose (MA *et al.*, 2020). A trombose consiste no aparecimento de um coágulo em algum vaso sanguíneo devido à formação excessiva de trombina e a sua manifestação mais frequente envolve as doenças cardiovasculares (DCV) ou tromboembólicas como a embolia pulmonar e a trombose venosa profunda (MOUMNEH; PENALOZA; ROY, 2018).

As DCV, como a trombose, e as doenças associadas a ela são as principais causas de morbimortalidade no mundo, estima-se que, em 2019, essas doenças foram responsáveis por 17,9 milhões de vítimas ao redor do mundo (WHO, 2021). No Brasil, em 2015, essas doenças resultaram em um custo financeiro de R\$ 56,2 bilhões, 62,9% desse valor esteve relacionado a custos do sistema de saúde (STEVENS *et al.*, 2017). As consequências das tromboembolias podem ser o bloqueio do fluxo sanguíneo, especialmente de vasos sanguíneos estreitos do cérebro e do coração, podendo levar ao acidente vascular cerebral (AVC), ao infarto do miocárdio (IM), a doença cardíaca coronária e a aterosclerose. Atualmente, alguns dos medicamentos

utilizados para o tratamento e prevenção de trombose são: ácido acetilsalicílico (AAS), clopidogrel, varfarina e heparinas (MA *et al.*, 2020).

Os medicamentos antitrombóticos são reconhecidos em duas classes principais, os antiagregantes e os anticoagulantes. As heparinas, a varfarina e o AAS começaram a ser utilizados na prática clínica antes mesmo de terem seus mecanismos de ação elucidados ou serem aprovados pelas agências reguladoras. Somente nas décadas de 1970 e 1980, 30 anos depois do início de seu uso, começaram os ensaios clínicos que demonstraram a efetividade dos anticoagulantes na prevenção e tratamento de tromboembolismo venoso (TEV) e outras DCVs (HIRSH; EIKELBOOM; CHAN, 2019).

Apesar de serem utilizados há décadas e de os estudos mostrarem eficácia clínica e capacidade de reduzir a mortalidade de diversas DCVs, alguns medicamentos antitrombóticos podem apresentar efeitos adversos como sangramentos espontâneos, hepatotoxicidade, neutropenia e, paradoxalmente, aumento da taxa de AVC (HIRSH; EIKELBOOM; CHAN, 2019).

Diante da importância das DCVs no cenário mundial e as limitações existentes nos medicamentos utilizados atualmente para o seu tratamento e prevenção, se faz necessária a realização de estudos que procurem descobrir compostos capazes de auxiliar na prevenção e tratamento dessas doenças (HIRSH; EIKELBOOM; CHAN, 2019).

Dihidropiridinas (DHPs) fazem parte da classe dos bloqueadores de canal de cálcio e são comumente utilizadas no tratamento de hipertensão, tendo como exemplos anlodipino e nifedipino. Elas atuam nos canais de cálcio dependentes de voltagem presentes em várias células. Estudos demonstraram que, apesar de as plaquetas não possuírem canais de cálcio voltagem dependente, essa classe possui efeitos inibitórios na atividade plaquetária, porém seus mecanismos de ação ainda não estão elucidados. Os primeiros estudos com as DHPs relacionados à atividade antiagregante demonstraram efeitos inibitórios apenas em concentrações duas a três vezes maiores que as terapêuticas, mostrando mais desvantagens do que benefícios ao sistema cardiovascular. Uma estratégia para minimizar os possíveis efeitos adversos e melhorar a eficácia foi modificar as estruturas das DHPs para aumentar sua atividade antitrombótica e tornar os compostos praticamente livres de efeitos cardiovasculares. Os estudos *in vitro* realizados após as modificações estruturais foram positivos (SUNKEL *et al.*, 1988).

A exemplo das DHPs modificadas, a química sintética possibilitou a descoberta, desenvolvimento e aprimoramento de moléculas e medicamentos. Técnicas como biocatálise,



quimioinformática e miniaturização de reação ajudam a acelerar o ritmo de produção e modular muitos alvos biológicos, melhorando a qualidade dos produtos na indústria farmacêutica. Na área dos produtos sintéticos, é necessário focar em um alvo terapêutico para obter um produto seguro e eficaz que seja capaz de modular adequadamente esse alvo. A química sintética também facilita o acesso a moléculas complexas e bioativas de maneira econômica. A estrutura do composto pode ser explorada tornando possível a identificação de um ligante adequado e talvez a descoberta de uma molécula de alto valor terapêutico. A “triagem de alto rendimento”, uma técnica que pode ser realizada utilizando a química sintética, possibilita avaliar diversos parâmetros de centenas de moléculas simultaneamente, no mesmo período que aconteceria a avaliação de uma única reação (CAMPOS *et al.*, 2019).

Visto que as DHPs que tiveram suas estruturas modificadas se mostraram promissoras na atividade antiagregante plaquetária, o presente trabalho objetivou investigar DHPs com diferentes estruturas e avaliar seu potencial antiagregante e anticoagulante, bem como avaliar *in silico* sua biodisponibilidade oral e toxicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, *in vitro*, o efeito de uma série de dihidropiridinas (DHP) sobre a hemostasia humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar, *in silico*, a biodisponibilidade oral, analisando a farmacocinética, semelhança com medicamento e compatibilidade química dos compostos;
- Verificar, *in silico*, a toxicidade das DHPs, avaliando mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos negativos sobre a reprodução e irritabilidade;
- Avaliar a ação das DHPs sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina;
- Avaliar o efeito das DHPs sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa);
- Investigar o efeito das DHPs sobre a viabilidade de plaquetas humanas;
- Selecionar o composto com melhor potencial para se tornar um antiagregante e avaliar os seus efeitos sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno, epinefrina e ácido araquidônico;
- Analisar se a atividade do composto selecionado é dependente do tempo de incubação e da concentração do composto, bem como determinar a concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) do composto;
- Investigar o efeito do composto selecionado sobre a ativação e secreção plaquetária.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 HEMOSTASIA

Hemostasia é o processo que garante a manutenção do fluxo sanguíneo em condições fisiológicas normais e impede a perda significativa de sangue após a lesão vascular (DÁVILA SINAÍ DEL CARMEN *et al.*, 2019). A hemostasia normal depende de um equilíbrio entre a trombose e a hemorragia, por meio de processos pró-trombóticos e antitrombóticos (ZAIDI; GREEN, 2019).

Para manter a fluidez sanguínea, a hemostasia busca, através de regulação bioquímica, o equilíbrio entre a formação excessiva e a falha na formação de coágulos (KLUFT; BURGGRAAF, 2011). Fisiologicamente, o sangue flui nos vasos sanguíneos sem interação com a parede vascular, uma vez que o endotélio atua como uma barreira, impedindo a interação das plaquetas com a camada subendotelial. Quando ocorre lesão em um vaso sanguíneo, o subendotélio e seus constituintes pró-trombóticos são expostos e interagem com as células sanguíneas, possibilitando a formação do coágulo, que auxilia na prevenção de hemorragia e na regeneração do vaso (AUSTIN, 2017).

Os processos hemostáticos acontecem simultaneamente, no entanto, didaticamente podem ser divididos em hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise. Após a lesão vascular, os atuantes da hemostasia primária, com o objetivo de limitar o sangramento, realizam a vasoconstrição e promovem a interação das plaquetas com o subendotélio. Durante a hemostasia secundária, conhecida como cascata da coagulação, acontece a formação do coágulo de fibrina a partir da ativação de proteínas. Após a regeneração do vaso lesado, a fibrinólise e os anticoagulantes naturais atuam para remodelar o trombo e reestabelecer o equilíbrio hemostático (AUSTIN, 2017).

#### 3.2 HEMOSTASIA PRIMÁRIA

##### 3.2.1 Endotélio vascular

O endotélio forma o revestimento de vasos sanguíneos e linfáticos e participa de várias funções fisiológicas, como hemostasia, permeabilidade, recrutamento de leucócitos,

imunidade inata e adquirida e alterações no tônus vasomotor (AIRD, 2015). Na hemostasia, o endotélio atua como pró-trombótico, antitrombótico e trombolítico, pois tem capacidade de sintetizar, armazenar e liberar proteínas vasoconstritoras, vasodilatadoras, anticoagulantes, pró-coagulantes e fibrinolíticas (KAZMI; BOYCE; L WALEED, 2015).

Em condições fisiológicas, sem lesão vascular, o endotélio não interage com os atuantes da hemostasia, visto que a camada luminal, que está em contato com o sangue, é repleta de substâncias trombo-resistentes, como a trombomodulina (um inibidor da via do fator tecidual - TFPI), o heparan e o óxido nítrico. A formação do coágulo pode se iniciar por lesão vascular, com consequente exposição do tecido subendotelial, que é altamente trombogênico por conter fator de von Willebrand (FvW) e colágeno (AIRD, 2015; KAZMI; BOYCE; L WALEED, 2015).

O FvW é uma glicoproteína presente na forma multimérica no plasma sanguíneo, nos grânulos alfa das plaquetas, no endotélio e no subendotélio. Ele é sintetizado e armazenado, principalmente, em células endoteliais e megacariócitos. Quando o subendotélio é exposto, essa glicoproteína se torna responsável pelo recrutamento das plaquetas ao local da lesão vascular, tal interação promove a ligação da GP1b $\alpha$  das plaquetas aos multímeros de FvW. Uma grande quantidade de FvW no sangue pode levar a eventos trombóticos, do mesmo modo que uma pequena quantidade pode gerar eventos hemorrágicos (SHAHIDI, 2016).

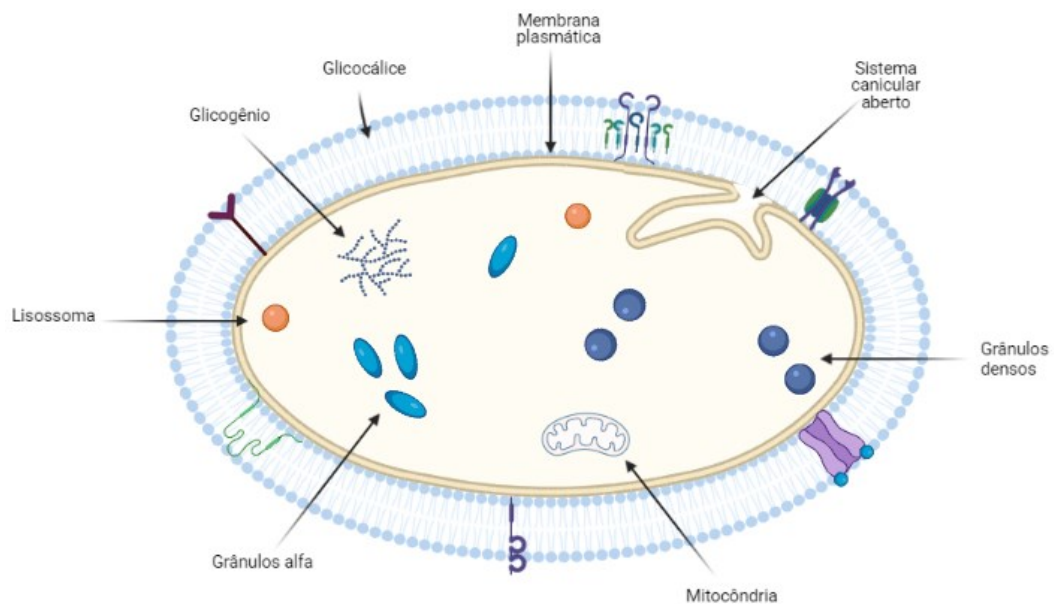
### **3.2.2 Plaquetas**

Plaquetas são células pequenas e anucleadas, formadas principalmente na medula óssea através da via hematopoiética dos megacariócitos (HOLINSTAT, 2017). O processo de formação das plaquetas é denominado trombopoiese e ocorre após a diferenciação das células-tronco em megacariócitos poliploides, estes, capazes de liberar protrusões citoplasmáticas chamadas de pró-plaquetas. A trombopoiese acontece quando existe uma contagem baixa de plaquetas na corrente sanguínea, dessa forma, a trombopoietina estimula os receptores de trombopoietina presentes nos megacariócitos e induz a formação das pró-plaquetas. Esse processo depende de rearranjos do citoesqueleto e garante uma distribuição de organelas, estruturas vesiculares e grânulos dos megacariócitos para as pró-plaquetas. Estudos *ex vivo* mostraram que as pró-plaquetas se desenvolvem e se dividem em plaquetas (MEIJDEN; HEEMSKERK, 2019).

Sendo as menores células sanguíneas, as plaquetas possuem um tamanho médio de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , diminuindo de tamanho quando mais velhas. Estão presentes na corrente sanguínea em quantidades que variam de 150 a 350 x 10<sup>9</sup> plaquetas/L, se tratando de indivíduos saudáveis (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016). Sua vida útil é limitada a aproximadamente 10 dias depois de sua formação e separação do megacariócito. No final da sua vida ou após ativação completa e participação no coágulo, as plaquetas são levadas até o baço por neutrófilos ou macrófagos e seguidamente removidas do organismo (HOLINSTAT, 2017).

As plaquetas são produzidas em grande quantidade, portanto, sua estrutura pode variar entre os indivíduos, bem como ter relação com processos patológicos. Devido a sua importância na hemostasia, um bom entendimento sobre a biologia das plaquetas é essencial para compreender tanto a saúde quanto a doença. (THOMAS, 2019). A estrutura das plaquetas em repouso pode ser dividida em zona periférica, zona sol-gel e zona de organelas (Figura 1) (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016).

**Figura 1** - Estrutura das plaquetas.



Zona periférica: região do glicocálice. Zona sol-gel: matriz interna. Zona das organelas: onde ficam localizadas as organelas. Fonte: A autora.

A zona periférica é constituída por uma camada de glicoproteínas e glicolípídios chamada de glicocálice. O glicocálice possui carga negativa, que evita a agregação espontânea das plaquetas e sua interação com outras células no fluxo sanguíneo normal. Em

relação a outras células sanguíneas, o glicocálice das plaquetas é mais espesso, sendo necessário devido ao grande número de receptores em sua superfície, que permitem perceber de imediato o dano vascular, também facilitam a adesão ao vaso sanguíneo, desencadeiam a ativação plaquetária e medeiam os processos de agregação e formação do trombo (THOMAS, 2019).

A matriz interna das plaquetas é chamada de zona sol-gel, tem semelhança com gel e é constituída por microtúbulos, microfilamentos, glicogênio, vesículas e organelas secretoras. Os microtúbulos formam o sistema que suporta o citoesqueleto contrátil da membrana e são necessários para manter a forma discoide das plaquetas em repouso. Os microfilamentos de actina formam o citoesqueleto citoplasmático, onde todas as organelas ficam suspensas e separadas. Após a ativação plaquetária, o sistema do citoesqueleto citoplasmático move as organelas para o centro das plaquetas, podendo resultar na secreção do conteúdo granular através do sistema canicular aberto (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016).

Três principais organelas secretoras fazem parte da zona das organelas, os grânulos alfa, os grânulos densos e os lisossomas, responsáveis pelo armazenamento de substâncias importantes para a função plaquetária. Além destes, as mitocôndrias, importantes para o metabolismo energético das plaquetas, também estão incluídas na zona das organelas (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016).

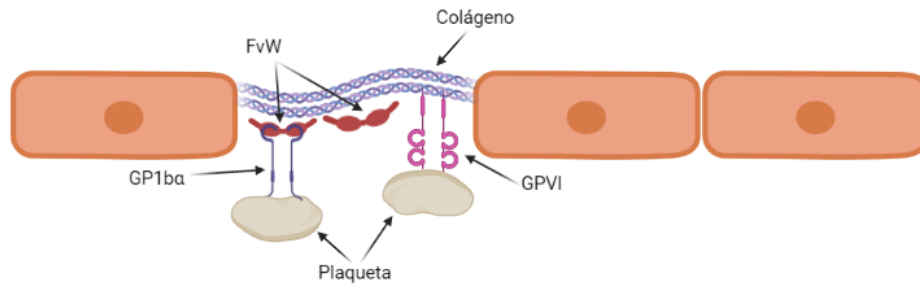
Além da importante participação na hemostasia, as plaquetas estão sendo reconhecidas como essenciais em outros processos fisiopatológicos como inflamação, aterogênese, defesa antimicrobiana, crescimento tumoral e metástase (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016). O papel principal das plaquetas está em auxiliar na manutenção da hemostasia primária e do fluxo sanguíneo nos vasos, para chegar a esse objetivo, as plaquetas atuam respondendo em vários estágios, sendo eles: adesão ao vaso lesado, ativação, secreção de grânulos e agregação (HOLINSTAT, 2017).

### **3.2.3 Adesão plaquetária**

Após danos à parede vascular, as proteínas da matriz subendotelial (FvW e colágeno) ficam expostas e acoplam receptores específicos à superfície das plaquetas. O FvW desempenha o papel de recrutamento das plaquetas ao local lesado do vaso, que ocorre através de ancoragem, neste processo é necessária a interação do domínio A1 do FvW com a porção Ib do complexo GPIb/V/IX das plaquetas. Para facilitar essa interação, o colágeno imobiliza a

macromolécula de FvW, possibilitando sua ligação a vários receptores de GPIb (KAPLAN; JACKSON, 2011). Além da GPIb, a GPVI também desempenha um importante papel na adesão, pois possibilita a interação direta do colágeno com as plaquetas (Figura 2) (CIMINNO; GOLINO, 2013).

**Figura 2** – Interações receptor-ligante na adesão plaquetária.

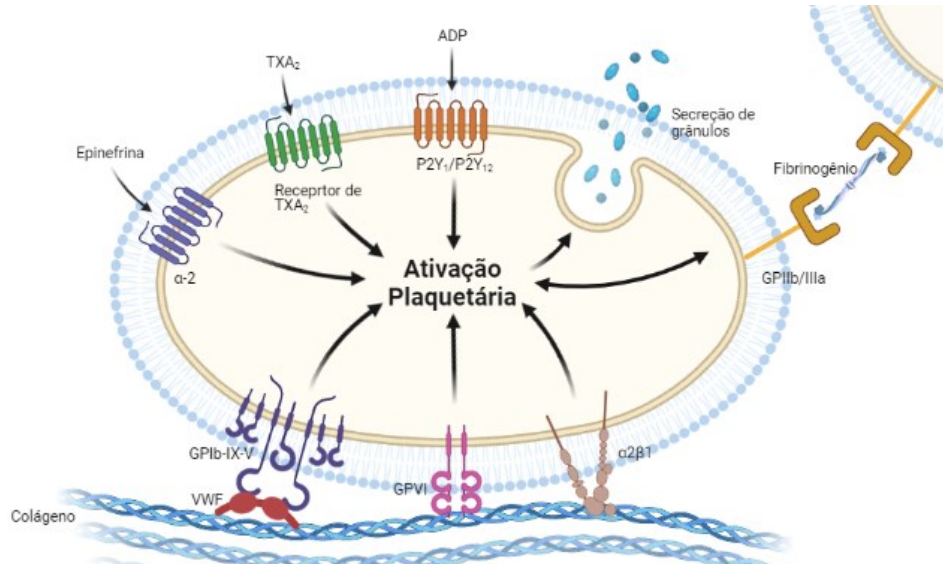


Fonte: A autora.

### 3.2.4 Ativação plaquetária

O processo de adesão plaquetária é capaz de desencadear sua ativação. Além da adesão, outros estímulos mecânicos e químicos, como a ligação de agonistas plaquetários a seus receptores específicos, podem desencadear a ativação plaquetária (Figura 3) (CIMMINO; GOLINO, 2013). Os principais agonistas plaquetários são ADP, trombina, tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), colágeno e epinefrina (JURK; KEHREL, 2005).

**Figura 3** – Interações receptor-ligante na ativação plaquetária.



Fonte: A autora.

O ADP se liga aos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> e ativa as plaquetas, quando utilizado só, é considerado um agonista fraco e sua resposta na ativação plaquetária é reversível. Ele fica concentrado nos grânulos densos das plaquetas, quando liberado, atua como agonista secundário, amplificando a agregação das plaquetas no local da lesão vascular. O receptor P2Y<sub>1</sub> inicia os processos de ativação e agregação plaquetária através da mobilização dos estoques de cálcio, enquanto o receptor P2Y<sub>12</sub> inibe a adenil ciclase. Apesar de o P2Y<sub>1</sub> iniciar a agregação plaquetária, esta só é finalizada quando o ADP se liga nos receptores P2Y<sub>12</sub>. A estimulação do P2Y<sub>12</sub> potencializa a secreção plaquetária e pode ajudar a estabilizar a agregação plaquetária induzida por TxA<sub>2</sub> ou trombina (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2018).

Por conta do aumento de influxo de cálcio e consequente reorganização dos filamentos de actina, a ativação das plaquetas gera mudanças na sua conformação, alterando-se de discoide (repouso) para esférica (ativada), e posterior extensão de pseudópodes. Além disso, durante a ativação plaquetária, a concentração de fibrinogênio e FvW no local do trombo aumenta e os grânulos plaquetários, que contém ADP e TxA<sub>2</sub>, são liberados. Esses eventos acontecem para amplificar e sustentar a ativação plaquetária para que o trombo consiga se manter estável no local lesado do vaso (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2018).



Além dos receptores P2Y1 e P2Y12, as plaquetas expressam em suas membranas os receptores ativados por protease (PAR1 e PAR4). Após a ligação da trombina nestes receptores, ambos os PARs podem desencadear secreção e agregação plaquetária, embora acredite-se que o PAR1 seja o mais importante. A trombina também se liga à GPIb, uma glicoproteína que faz parte do complexo GP Ib/V/IX e faz interações com o FwV e a P-selectina, ambos relacionados à adesão e ativação plaquetária (COUGHLIN, 2005).

O TxA<sub>2</sub> é um metabólito do ácido araquidônico, seu nome faz referência a seu papel na trombose pois estimula a ativação e a agregação plaquetária, incluindo secreção e mudança de forma das plaquetas. Por conta da sua meia-vida curta, o TxA<sub>2</sub> ativa plaquetas adjacentes e, por meio de *feedback* positivo, gera mais TxA<sub>2</sub>, amplificando a ação de outros agonistas plaquetários mais potentes (NAKAHATA, 2008).

Assim como ADP, a epinefrina é liberada nos grânulos densos durante a ativação plaquetária e é capaz de se ligar aos receptores adrenérgicos do tipo  $\alpha_2$  presentes nas plaquetas. Seu efeito na ativação plaquetária é semelhante ao do ADP, pois inibe a adenil ciclase e gera mobilização dos estoques de cálcio (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2018).

O colágeno, ao contrário dos agonistas citados acima, não se liga em nenhum receptor acoplado à proteína G, seu receptor é conhecido como GpVI. Quando ocorre a ligação do colágeno a seu receptor, a concentração de cálcio no interior da plaqueta aumenta e, subsequentemente, os eventos da ativação plaquetária ocorrem. Como o colágeno faz parte da matriz subendotelial, a ativação das plaquetas por meio da GpVI só irá ocorrer quando houver contato de plaquetas com o local lesado do vaso (TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017).

### 3.2.5 Secreção plaquetária

Como mencionado, a ativação plaquetária resulta no aumento do cálcio intravascular, mudança da forma das plaquetas por conta da reorganização dos filamentos de actina e na secreção de grânulos. A liberação do conteúdo dos grânulos vai resultar em amplificação da ativação das plaquetas (FRYDMAN; PATE; VITSKY, 2018).

Para auxiliar em suas funções, as plaquetas possuem três tipos de grânulos: grânulos  $\alpha$ , grânulos densos e lisossomos (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013). A maior população de grânulos é representada pelos grânulos  $\alpha$ , superam os outros dois tipos tanto em tamanho quanto em quantidade. Estão presentes nos grânulos  $\alpha$  alguns fatores de coagulação,

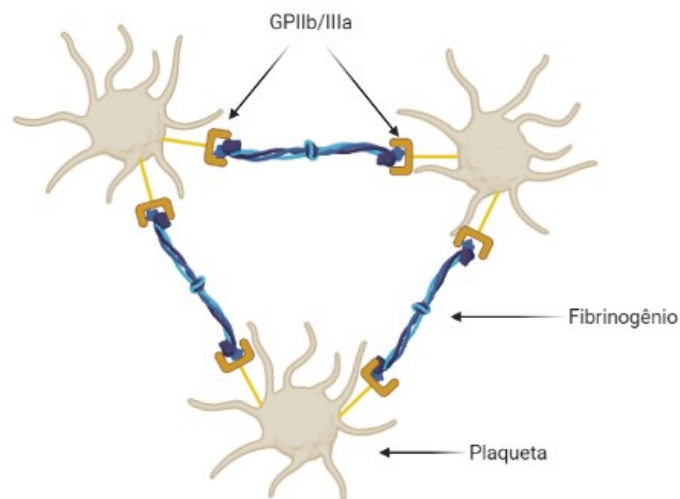
glicoproteínas como GpVI e GpIIb/IIIa, proteínas adesivas como FvW e a P-selectina (RENDU; BROHARD-BORN, 2001).

Os grânulos densos são os menores grânulos das plaquetas, constituídos por moléculas não proteicas. Neles ficam armazenados moléculas como serotonina, ADP, epinefrina e íons cálcio (RENDU; BROHARD-BORN, 2001). O terceiro tipo de grânulos, lisossomos, contém proteases e enzimas que podem auxiliar na remodelação do trombo e depuração de plaquetas (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013).

### 3.2.6 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária acontece após sua ativação e se caracteriza pelas conexões entre plaquetas. Durante a ativação plaquetária, a GPIIb/IIIa muda sua conformação e possibilita a ligação de fibrinogênio, o fibrinogênio atua como uma espécie de ponte, ligando uma plaqueta em outra, como mostra a Figura 4 (ZAIDI; GREEN, 2019). Algumas outras glicoproteínas como fibronectina e FvW também se ligam a estes receptores e o resultado dessas múltiplas ligações é a formação de um tampão hemostático (CIMMINO; GOLINO, 2013).

**Figura 4** – Interações entre plaquetas durante a agregação.



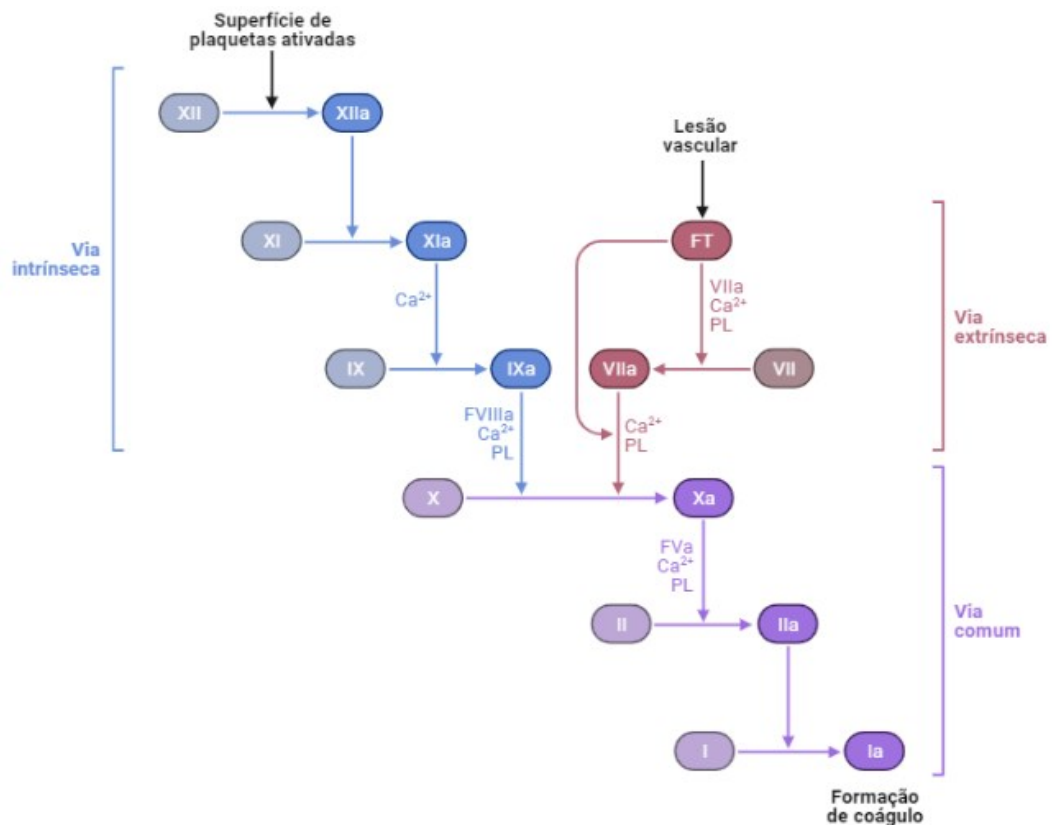
Fonte: A autora

### 3.3 HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

#### 3.3.1 CASCATA DA COAGULAÇÃO

O processo de coagulação é composto pela interação de enzimas e seus cofatores, que tem por objetivo formar um coágulo de fibrina estável. O conceito clássico de cascata de coagulação considera as vias extrínseca e intrínseca independentes (Figura 5). Este modelo permanece útil *in vitro*, visto que os ensaios de tempo de protrombina (TP), que avalia a via extrínseca, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), utilizado para investigar a via intrínseca e tempo de tromboplastina (TT) que avalia a conversão de fibrinogênio em fibrina, foram desenvolvidos a partir do conceito clássico (AUSTIN, 2017).

**Figura 5** – Representação esquemática da cascata de coagulação.



a – ativado; FT – fator tecidual. Fonte: A autora.

*In vivo*, as vias de coagulação são integradas, portanto, o novo modelo proposto para o processo de coagulação inclui três fases, sendo: iniciação da coagulação, amplificação e

propagação. A fase de iniciação ocorre logo após o dano ao vaso, no momento em que o fator VII (FVII) ou fator VII ativado (VIIa) se liga ao fator tecidual (FT) presente no subendotélio. O complexo FT-VIIa ativa uma pequena parcela dos fatores IX (FIXa) e X (FXa) (GREEN, 2006; AUSTIN, 2017). Durante a fase de propagação, o FXa liga-se ao fator V ativado (FVa) e gera trombina, que possibilita a indução da agregação plaquetária e a ativação dos fatores V e VIII (FVIIIa). A fase de amplificação é necessária para manter a hemostasia, nessa fase, os fatores IXa e VIIIa formam o complexo tenase e ativam o fator X (AUSTIN, 2017).

### 3.4 FIBRINÓLISE

Assim como a cascata de coagulação, a fibrinólise, também conhecida como hemostasia terciária, é controlada por cofatores, inibidores e receptores. Este processo tem como objetivo remover o coágulo de fibrina após a regeneração do vaso lesado (CHAPIN; HAJJAR, 2015).

O plasminogênio é um dos principais participantes do processo de fibrinólise, o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), cliva o plasminogênio em plasmina e sua atividade é aumentada quando ligado à superfície da fibrina. A plasmina, por sua vez, é responsável por hidrolisar as ligações da arginina-lisina presentes na estrutura do fibrinogênio, da fibrina e dos fatores V, VIII e XIII. A degradação de fibrinogênio e fibrina inibem a polimerização de trombina e fibrina. A fibrinólise excessiva, que pode gerar uma hemorragia, é evitada pela inibição de tPA e plasmina (AUSTIN, 2017).

### 3.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TRATAMENTO

As DCVs têm sido relacionadas a desequilíbrios no sistema nervoso. O sistema nervoso simpático é ativado nos momentos de estresse, consequentemente se elevam as concentrações sanguíneas de cortisol e epinefrina. Concentrações elevadas destes hormônios elevam a pressão arterial e a frequência cardíaca, além disso, o sistema imunológico libera diversas citocinas inflamatórias. Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático reduz os níveis de cortisol e epinefrina, com o intuito de compensar os efeitos do simpático. Com o frequente desequilíbrio do sistema nervoso, o organismo tende a ficar “deslocado” por conta da super-reação do sistema simpático, elevando as concentrações dos hormônios cronicamente, bem como pressão arterial e frequência cardíaca em longo prazo. A inflamação

e o estresse oxidativo causados pela superativação do sistema simpático são responsáveis pelo surgimento ou agravamento de várias doenças, entre elas, as DCV (AGGARWAL; AGGARWAL; RAO, 2017).

As DCVs fazem parte do grupo das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), responsáveis por aproximadamente 38 milhões (70%) de mortes por ano ao redor do mundo. Cerca de 45% (17 milhões) das mortes por DCNT são causadas por DCV. No Brasil, as DCVs são a principal causa de morte, configurando 30% das mortes por DCNT. Entre os anos 2008 e 2019, os gastos públicos com DVCs no Brasil, incluindo hospitalizações e procedimentos cirúrgicos, ultrapassaram 19,9 milhões de reais (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

O tratamento das DCVs é realizado com medicamentos antitrombóticos, tendo estes, duas principais classes, os antiagregantes plaquetários (por exemplo, clopidogrel e ácido acetilsalicílico) e os anticoagulantes (por exemplo, rivaroxabana e varfarina). Os antiagregantes plaquetários têm como alvo principal as plaquetas, portanto, seu direcionamento farmacológico utiliza como estratégia inibir os fatores de ativação plaquetária ou seus receptores. Os fármacos anticoagulantes agem na cascata de coagulação, tendo como principais mecanismos de ação o antagonismo aos fatores de coagulação ou à vitamina K (MEGA; SIMON, 2015).

Na escolha do tratamento com fármacos antitrombóticos, deve-se considerar cuidadosamente a relação eficácia/segurança. Ainda existem muitas limitações em relação aos medicamentos disponíveis hoje, como baixas taxas de absorção, interações medicamentosas e alvos inespecíficos, que podem levar a episódios de sangramento (MEGA; SIMON, 2015).

### 3.6 COMPOSTOS SINTÉTICOS

Conforme citado acima, os medicamentos antitrombóticos apresentam muitas limitações, sendo necessária a busca por novos agentes antiagregantes ou anticoagulantes que apresentem melhores propriedades farmacocinéticas. As inovações da química sintética possibilitam a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos importantes para a saúde dos pacientes ao redor do mundo. A utilização de novos métodos sintéticos como miniaturização de reações, biocatálise e quimioinformática conseguem, com excelência, melhorar a qualidade e acelerar o ritmo de produção de produtos farmacêuticos. Expandir o domínio da matéria química e torná-la acessível possibilita reconhecer e modular uma nova gama de alvos

biológicos e, conseqüentemente, mudar a prática de descoberta de novos medicamentos (CAMPOS *et al.*, 2019).

Considerando o ambiente desafiador das doenças humanas, é essencial que os pesquisadores consigam selecionar alvos biológicos relevantes e encontrar entidades químicas seguras e eficazes para a terapêutica. Os métodos químicos e sintéticos fornecem um bom ponto de partida para o desenvolvimento de um medicamento de sucesso, pois o espaço químico possui ferramentas que possibilitam explorar e extrair um ligante adequado e buscar estudos preliminares relacionados ao composto de interesse (CAMPOS *et al.*, 2019).

### 3.6.1 Dihidropiridinas

As dihidropiridinas (DHP) fazem parte da classe dos bloqueadores de canais de cálcio, utilizados para tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial. O exemplo mais comum de uma DHP utilizada como medicamento anti-hipertensivo é o nifedipino (MEREDITH; ELLIOT, 2004).

Como anti-hipertensivos, as DHP são efetivas e apresentam poucos efeitos colaterais. Além da redução da pressão arterial, outros efeitos benéficos foram observados nas DHP, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Vários estudos relatam que sua propriedade anti-inflamatória ocorre pela supressão do fator de necrose tumoral (TNF) e da proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP1), além de redução da ativação de NF- $\kappa$ B em células vasculares. Tais propriedades podem contribuir para evitar aterosclerose (CHOU, 2014).

Em pacientes tratados com nifedipino, observou-se, além da redução de pressão arterial, a redução de novas lesões coronárias, demonstrando que o nifedipino possui efeitos anti-ateroscleróticos além do efeito anti-hipertensivo. A proteção em relação às lesões coronárias pode ser devido à diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis por respostas inflamatórias subsequentes. O nifedipino é capaz de inibir a agregação plaquetária, embora as plaquetas não possuam canais de cálcio do tipo L. Até o momento, o mecanismo de ação proposto para a inibição plaquetária tem relação com a via dependente de óxido nítrico e GMP cíclico (NO/cGMP) (CHOU, 2014).

Embora o mecanismo antiagregante plaquetário do nifedipino ainda permaneça não totalmente esclarecido, a classe das dihidropiridinas parece promissora para novos agentes antitrombóticos.

## 4 METODOLOGIA E ASPECTOS ÉTICOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE 12353019.0.0000.0121 – Anexo A).

### 4.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Para a realização do estudo, foram coletadas amostras de sangue periférico de voluntários que foram ao Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH para realizar exames. Os voluntários que estavam aptos para participar do estudo foram informados sobre os procedimentos da pesquisa e ficaram cientes sobre os riscos e benefícios do estudo, sendo posteriormente questionados sobre aceitação para a participação. Após a assinatura do Termo de Comprometimento Livre e Esclarecido (TCLE), foi coletado dois tubos de sangue contendo citrato de sódio a 3,2% (9:1 v/v) como anticoagulante. Logo após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) e processadas de acordo com cada experimento a ser realizado no dia. Foram incluídos no estudo apenas voluntários que não fizeram uso de antiagregantes, anticoagulantes ou anti-inflamatórios não esteroides nos últimos 10 dias e que não tinham histórico de doença hepática.

### 4.3 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

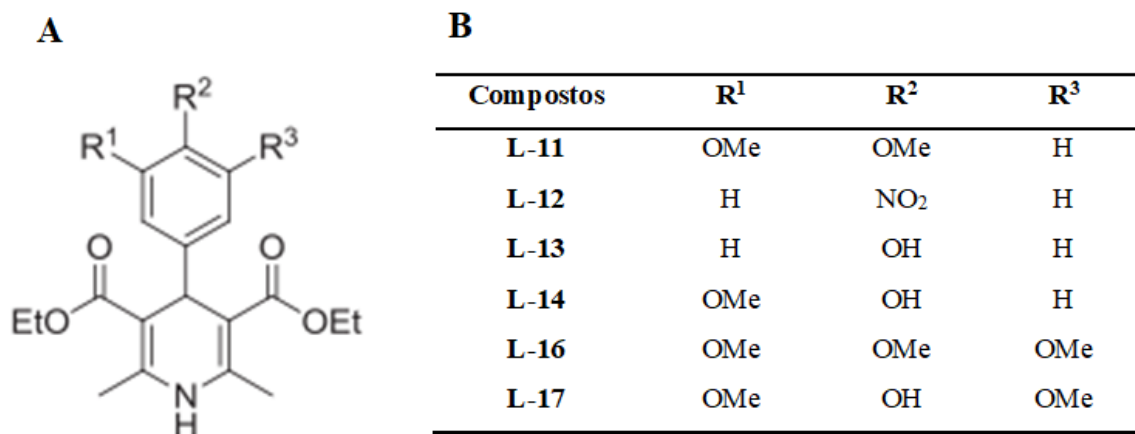
Os compostos (Figuras 6 e 7) foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo doutorando Luiz Antônio Escorteganha Pollo, discente do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, orientado pela Professora Dra. Maique Weber Biavatti do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e coorientado pelo Professor Dr. Louis P. Sandjo do Departamento de Química da UFSC.

### 4.3.1 Síntese dos compostos

Para as DHPs, aldeído foi dissolvido em etanol, então acetoacetato de etila foi adicionado a NH<sub>4</sub>OAc no balão de reação, a mistura de reação foi agitada sob temperatura de refluxo entre 16 e 68 h. A reação foi interrompida e o solvente foi removido sob pressão reduzida, a mistura de reação bruta foi submetida a um sistema de extração líquido/líquido com salmoura/acetato de etila, os orgânicos combinados foram secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrados sob pressão reduzida e submetidos a uma purificação cromatográfica (POLLO *et al.*, 2017).

Para as DHP N-feniladas, aldeído foi dissolvido em, então acetoacetato foram adicionados a anilina no balão de reação, a mistura foi agitada sob temperatura de refluxo entre 16 e 30 h. A reação foi interrompida e o solvente foi seco sob pressão reduzida, a mistura de reação bruta foi então submetida a um sistema de extração líquido/líquido com salmoura/acetato de etila, os orgânicos combinados foram secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, concentrados sob pressão reduzida e purificados por uma coluna cromatográfica (POLLO *et al.*, 2017).

**Figura 6** – Estrutura química básica e substituintes das dihidropirinas.

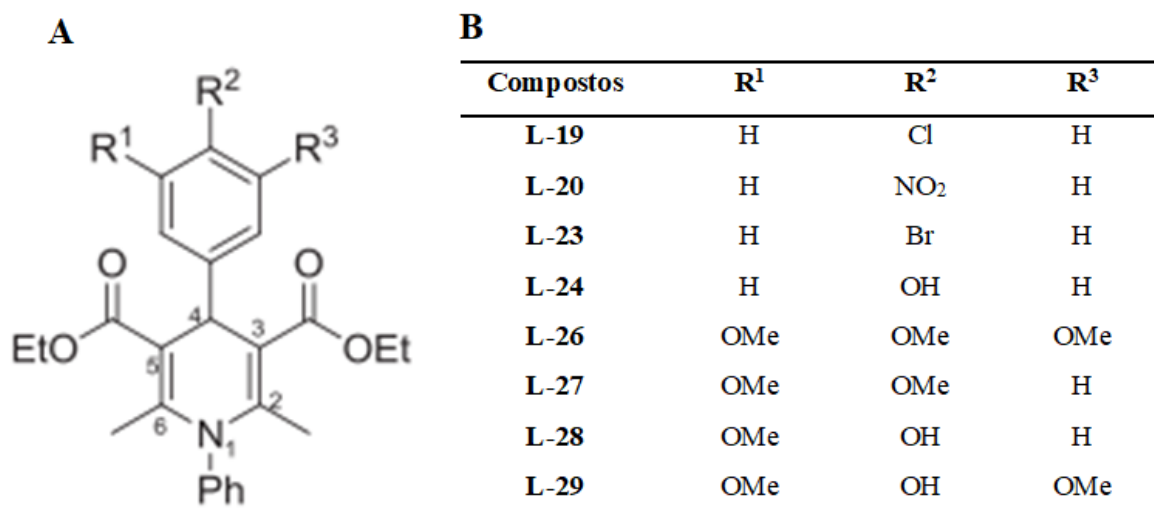


Painel A: Estrutura química básica das dihidropiridinas. Painel B: Substituintes das dihidropiridinas. R<sup>1</sup> – radical 1; R<sup>2</sup> – radical 2; R<sup>3</sup> – radical 3. O composto L-15 não possui radical nas posições indicadas na Figura 6. Fonte:

POLLO *et al.* 2017.



**Figura 7** – Estrutura básica e substituintes das dihidropirinas N-felinaladas.



Painel A: Estrutura química básica das dihidropiridinas N-feniladas. Painel B: Substituintes das dihidropiridinas N-feniladas. R<sup>1</sup> – radical 1; R<sup>2</sup> – radical 2; R<sup>3</sup> – radical 3. Fonte: POLLO *et al.* 2017

#### 4.3.2 Solubilização dos compostos

Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) puro de forma a ficarem em uma concentração de uso de 100 mM. Após a solubilização, os compostos foram armazenados à temperatura ambiente, em local seco e protegido da luz. Para a realização dos experimentos, um volume da solução de uso foi diretamente adicionado à amostra (plasma) de modo a obter concentrações finais de 62,5 a 500 µM e uma concentração de DMSO não superior a 0,5% v/v. O DMSO 0,5% (v/v) foi utilizado como controle negativo em todos os experimentos realizados.

#### 4.4 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE BIODISPONILIDADE ORAL

A biodisponibilidade oral das DHPs foi avaliada utilizando-se o SwissADME, uma ferramenta *online* desenvolvida pelo Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) que está disponível em <http://www.swissadme.ch/> e avalia de forma teórica a farmacocinética, semelhança com medicamentos e a compatibilidade química medicinal de compostos. Os compostos foram avaliados segundo critérios estabelecidos por Lipinski *et al.* (1997) e Veber *et al.* (2002), sendo eles: mLogP, peso molecular (PM), número de aceptores de ligação de

hidrogênio (átomos de N e O), número de doadores de ligação de hidrogênio (radicais NH e OH), número de ligações rotacionáveis e área de superfície polar (TPSA).

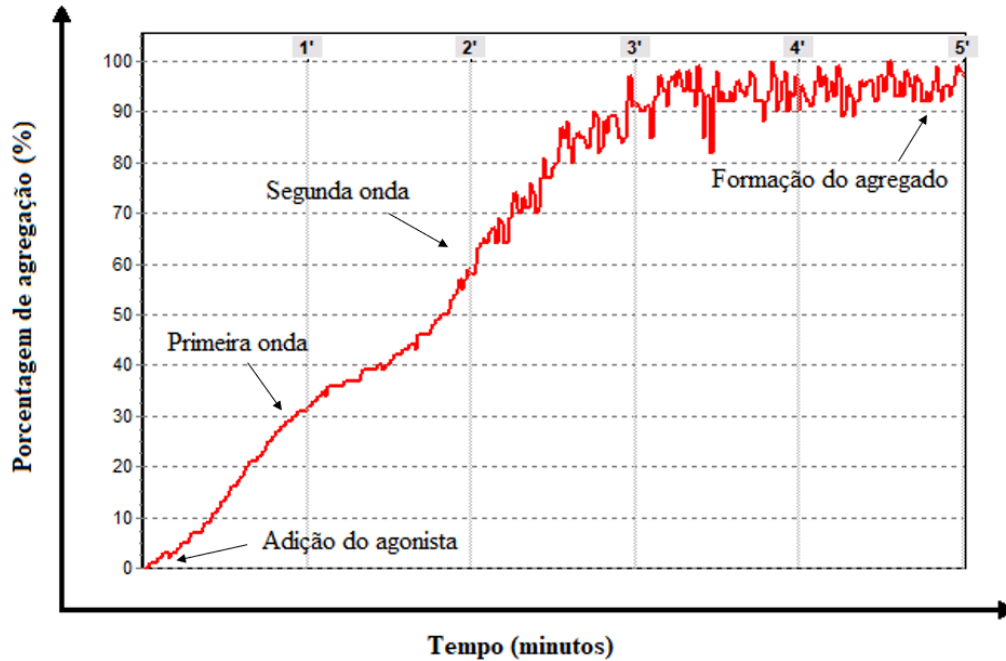
#### 4.5 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE TOXICIDADE

Os ensaios de toxicidade foram realizados por meio do *Osiris® Property Explorer*, um programa gratuito que, ao analisar a estrutura química dos compostos, mostra propriedades relevantes de medicamentos e possíveis medicamentos. As propriedades avaliadas foram: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade (pele e olhos) e efeitos negativos sobre a reprodução.

#### 4.6 ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação plaquetária foram descritos pela primeira vez por Born e Cross (1963), neste trabalho, eles foram realizados utilizando um agregômetro semiautomatizado (AgreGO, Qualiterm). A agregação por transmitância de luz registra a mudança de absorbância quando um plasma rico em plaquetas (PRP) é estimulado com agonistas e agitado. O PRP é a amostra a ser analisada, portanto, sua agregação ou transmissão de luz começa em zero e pode ir até 100%. O plasma pobre em plaquetas (PPP) é utilizado como referência, ou seja, 100% de transmissão de luz ou menos de 10.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. A formação das curvas de agregação se dá pela diferença da transmissão de luz entre o PRP e o PPP. Em uma resposta normal de agregação plaquetária, existe a formação de duas ondas. Como mostra a Figura 8, com a adição de um agonista, as plaquetas mudam sua forma, de discoide para esférica e iniciam a formação de agregados plaquetários, registrando um aumento na transmissão de luz e formando a primeira onda. Se o estímulo para as plaquetas for forte o bastante, os processos de aumento de sinal e liberação de grânulos vão acontecer, formando a segunda onda de agregação. A porcentagem de agregação e a formação final do agregado plaquetário é medida em tempo, neste caso 5 minutos, ou quando a curva atinge um platô (FRONTROTH, 2013).

**Figura 8** – Representação da curva de agregação plaquetária.



Fonte: A autora.

Para a realização dos ensaios de agregação plaquetária, as amostras citradas foram centrifugadas a 123 g por 10 minutos a temperatura ambiente, obtendo-se, assim, o PRP. Em seguida, os plasmas foram transferidos a um tubo de fundo cônico de 15 mL para a obtenção de um *pool* de PRP. As plaquetas do *pool* de PRP foram enumeradas utilizando-se câmara de Neubauer e, posteriormente, o volume de *pool* de PRP foi ajustado com PBS para obter uma concentração de aproximadamente 250.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Para a avaliação do efeito dos compostos sobre a agregação plaquetária, 400 µL de PRP foram incubados com os compostos (500 µM) ou DMSO por 5 minutos a 37 °C. Como controle positivo, utilizou-se ticlopidina (10 mM). Após a incubação, as plaquetas foram estimuladas com a adição de 10 µL adenosina difosfato (ADP; 0,4µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) ou 10 µL epinefrina (1mg/mL, Hipolabor) e a agregação foi acompanhada continuamente durante 5 minutos utilizando-se o software do AgreGO. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, utilizou se PPP, obtido por meio da centrifugação das amostras de sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sem exceder o tempo de três horas após a coleta. Os resultados foram expressos como

porcentagem média de agregação e desvio padrão, e os perfis das curvas de agregação foram analisados individualmente.

#### 4.7 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Os testes de coagulação sanguínea foram realizados utilizando-se o equipamento semiautomatizado (CLOTimer, Quick Timer) e os conjuntos diagnóstico TP Clot e TTPa Clot da empresa BIOS Diagnóstica (Sorocaba, SP). Para a realização dos ensaios, foi obtido o PPP por meio da centrifugação das amostras a 1107 g durante 15 minutos. Posteriormente, os plasmas foram transferidos para um tubo de fundo cônico de 15 mL para a obtenção de um *pool* de PPP. Para a realização do TP, teste que avalia a via extrínseca da coagulação, 100 µL do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C com os compostos (500 µM) ou DMSO durante 5 minutos. Como controle positivo, utilizou-se heparina (17 IU/mL de sangue total). Após a incubação, foi adicionado o ativador da coagulação. Na realização do TTPa, teste que avalia a via intrínseca da coagulação, aos 100 µL de *pool* de PPP, foram adicionados o reagente de TTPa e os compostos (500 µM), DMSO ou heparina (17 IU/mL de sangue total). A mistura foi incubada a 37 °C por 5 minutos e, posteriormente, adicionou-se o cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) como ativador da coagulação. Todos os testes foram realizados em triplicata, sem exceder o tempo de três horas após a coleta.

Os resultados foram expressos como tempo médio em segundos para a formação do coágulo de fibrina e desvio padrão. Adicionalmente, os resultados de TP foram expressos como razão normalizada internacional (RNI), com um intervalo de referência entre 1,0 e 1,3 para indivíduos saudáveis (SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2018). Os resultados de TTPa foram expressos como a razão do TTPa, podendo variar entre 1,0 e 1,5 em indivíduos saudáveis (GREINACHER *et al.*, 2000).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE COM AZUL DE *TRYPAN*

A avaliação da viabilidade plaquetária foi realizada por meio do teste de exclusão com azul de *Trypan*. Para a realização dos testes, 400 µL do *pool* de PRP foram incubados com os compostos (500 µM) ou DMSO durante 5 minutos. Como controle positivo, utilizaram-se os reagentes *FIX & PERM*, resumidamente, 100 µL do reagente FIX-A foram incubados com 100 µL do *pool* de PRP durante 15 minutos, lavados com 1 mL de PBS e em

seguida centrifugados a 264 g durante 5 minutos. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e o processo foi repetido com o reagente FIX-B. Posteriormente às incubações, 50 µL de PRP tratado (compostos e controles) foram individualmente misturados com um volume igual de azul de *Trypan* 0,04% e transferidos para uma câmara de Neubauer para a contagem de plaquetas totais e de plaquetas não viáveis. A viabilidade plaquetária foi determinada usando a Equação 1. Os resultados foram apresentados como porcentagem média de plaquetas viáveis e desvio padrão, e todos os experimentos foram realizados em triplicata, sem exceder o tempo de três horas após a coleta.

$$\text{Equação 1 - \% de células viáveis} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA CI<sub>50</sub> DO COMPOSTO L-11

Após os estudos de triagem, o composto L-11 foi selecionado para dar continuidade aos experimentos, sendo o primeiro deles a determinação da CI<sub>50</sub>. A concentração em que um composto é capaz de induzir 50% da inibição é denominada CI<sub>50</sub> (GOMIS-TENA *et al.*, 2020). Para a determinação da CI<sub>50</sub>, foram realizadas diluições do composto, e o PRP foi tratado com estas diluições (62,5; 125; 142,8; 166,6; 250; 333,3 e 500 µM) ou com DMSO e, posteriormente, estimulado com epinefrina, colágeno (2 µg/mL; Chrono-Log Corp, Havertown, EUA) ou ácido araquidônico (2 µg/mL; Chrono-Log Corp, Havertown, EUA). A agregação foi realizada conforme descrito no item 4.6. Para calcular a CI<sub>50</sub>, utilizou-se a curva concentração-resposta do software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata sem exceder três horas após a coleta da amostra.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO L-11 EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INCUBAÇÃO

Para avaliar se o efeito do composto L-11 era dependente do tempo de incubação com o PRP, 400 µL do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 ou 15 minutos com o composto L-11 (333,3 µM) ou com DMSO. Logo após, as amostras foram estimuladas individualmente com 10 µL de epinefrina (5 µg/mL) ou 2 µL de colágeno (2 µg/mL), e a

agregação foi acompanhada por 5 minutos utilizando-se o software AgreGo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata sem exceder três horas após a coleta da amostra. Os resultados foram expressos como porcentagem média de agregação e desvio padrão.

#### 4.11 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE P-SELECTINA

O efeito do composto L-11 sobre a ativação plaquetária foi avaliado pela metodologia de citometria de fluxo por meio da determinação da expressão de P-selectina, utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-CD62P-PE (clone AK-4; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

O CD62P, também conhecido como P-selectina, é um componente dos grânulos- $\alpha$  e se expressa na membrana das plaquetas durante e após a secreção destes grânulos. Em vista disso, o anti-CD62P-PE é geralmente considerado o marcador padrão ouro para avaliar a ativação plaquetária (CHO *et al.*, 2020).

As plaquetas são células pequenas e de tamanho variado e, com o propósito de facilitar sua identificação por citometria de fluxo, elas foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD61-PerCP (clone PN IM 1758U; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), capaz de se ligar em plaquetas ativas e inativas (LEVINE; BROOKS, 2019). Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA) utilizando os *lasers* azul (488 nm, *air-cooled*, 20 mW *solid state*) e vermelho (633 nm, 17 mW HeNe), e o software FACSDiva versão 6.1.2 (Becton Dickinson, EUA).

Para a marcação com os anticorpos, 400  $\mu$ L do *pool* de PRP foram incubados por 5 minutos com o composto utilizando uma concentração aproximada de 200  $\mu$ M ou com DMSO em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram estimuladas com AA (0,5 mM) e incubadas por mais 5 minutos. Após, foram adicionados os anticorpos monoclonais, anti-CD62P-PE (5  $\mu$ L) e anti-CD61-PerCP (2  $\mu$ L), e as amostras foram reservadas durante 15 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 277 g por 5 minutos. Para finalizar, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi suspenso em 500  $\mu$ L de PBS e analisado imediatamente no citômetro de fluxo. Para utilizar como controle de autoativação, um tubo contendo plaquetas sem estímulo do agonista também foi marcado com os anticorpos monoclonais.

Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados no software *Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. A população de plaquetas foi identificada através dos parâmetros de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente) e pelas características de expressão de CD61/SSC. Em cada tubo foram analisados 10.000 eventos positivos para CD61 na forma de histogramas e intensidade de fluorescência média (IFM). A IFM dos marcadores foi representada por meio da porcentagem de inibição, para isto se utilizou a *merge* das duplicatas, sendo calculada conforme a Equação 2 (CASSAR *et al.*, 2003).

**Equação 2** – Cálculo da porcentagem de inibição da ativação plaquetária a partir da intensidade de fluorescência média (IFM).

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

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

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) ou média ± erro padrão (EP). A análise estatística foi efetuada com o auxílio do software MedCalc® e para a construção gráfica foi utilizado o software GraphPad Prism 5®. As médias das variáveis foram comparadas utilizando-se teste t de *Student* ou a análise de variância de uma via (ANOVA de uma via) seguida do pós-teste de Bonferroni ou Tukey. Foi adotado um nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 BIODISPONIBILIDADE ORAL TEÓRICA DAS DHPS

Os parâmetros de biodisponibilidade oral foram avaliados pela ferramenta SwissADME (Tabela 1). De acordo com a análise dos compostos, apenas quatro deles apresentaram uma violação dos critérios de Lipinski *et al.* (1997) e Veber *et al.* (2002). Os compostos L-16, L-26, L-27 e L-29 apresentam número de ligações rotacionáveis igual ou superior ao ideal, sendo 10, 11, 10 e 10, respectivamente.

**Tabela 1** - Parâmetros teóricos de biodisponibilidade oral das dihidropiridinas determinados pela ferramenta SwissADME

Parâmetro	mLogP	PM(g/mol)	n° O+N	n° OH+NH	n° rotb	TPSA(A)	n° violações
Ideal	≤ 4,15	< 500	≤ 10	≤ 5	< 10	≤ 140	≤ 1
L-11	1,60	389,44	6	1	9	83,09	0
L-12	1,30	374,38	6	1	8	110,45	0
L-13	1,68	345,39	5	2	7	84,86	0
L-14	1,37	375,42	6	2	8	94,09	0
L-15	2,60	355,43	4	1	8	64,63	0
L-16	1,30	419,47	7	1	10	92,32	1
L-17	1,08	405,44	7	2	9	103,32	0
L-19	4,04	439,93	4	0	8	55,84	0
L-20	2,65	450,48	6	0	9	101,66	0
L-23	4,14	484,38	4	0	8	55,84	0
L-24	3,02	421,49	5	1	8	76,07	0
L-26	2,57	495,56	7	0	11	83,53	1
L-27	2,90	465,54	6	0	10	74,30	1
L-28	2,70	451,51	6	1	9	85,30	0
L-29	2,38	481,54	7	1	10	94,53	1

mLogP – estimativa de LogP (lipofilia); PM – peso molecular; n° O+N – número de aceptores de ligação de H; n° OH+NH – número doadores de ligação de H; n° rotb – número de ligações rotacionáveis; TPSA – área de superfície polar topológica; n° violações – número de violações. Fonte: A autora.



## 5.2 TOXICIDADE TEÓRICA DAS DHPS

Os ensaios de toxicidade teórica realizados utilizando-se o software *Osiris*® *Property Explorer* sugeriram que todos os compostos apresentaram baixo risco para os parâmetros avaliados (Tabela 2), sendo eles: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeito negativo sobre a reprodução.

**Tabela 2** - Parâmetros de toxicidade teórica das dihidropiridinas avaliados pelo software *Osiris*® *Property Explorer*

<b>Parâmetro</b>	<b>Mutagen.</b>	<b>Tumorigen.</b>	<b>Irritabilidade</b>	<b>Ef. neg. sobre rep.</b>
<b>Ideal</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-11</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-12</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-13</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-14</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-15</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-16</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-17</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-19</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-20</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-23</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-24</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-26</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-27</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-28</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>L-29</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo

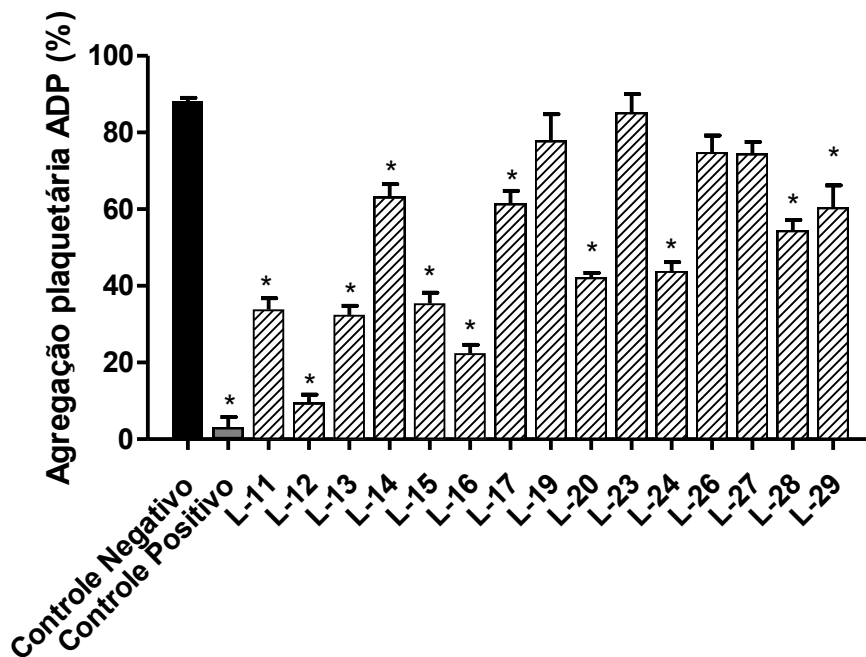
Mutagen. – mutagenicidade; Tumorigen. – tumorigenicidade; Ef, neg. sobre rep. – efeitos negativos sobre a reprodução. Fonte: A autora.

## 5.3 EFEITO DAS DHPS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Inicialmente, avaliou-se se os compostos eram capazes de inibir a agregação plaquetária quando incubados em alta concentração (500 µM) com o PRP. Como pode ser

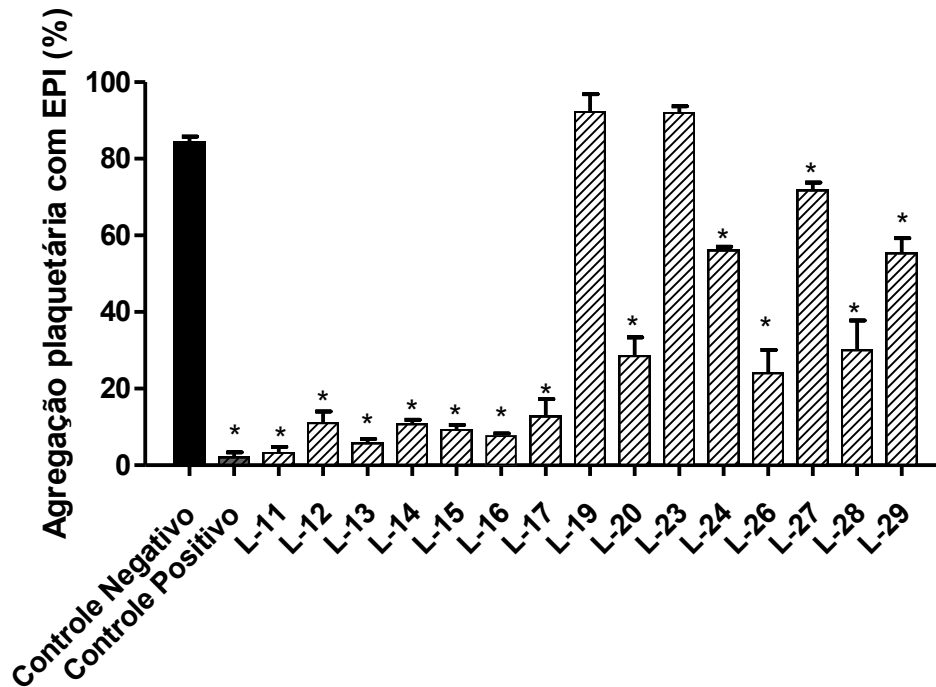
observado nas Figuras 9 e 10, as DHPs L-11 a L-17 inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina quando comparados com o controle negativo. Destas, L-11 e L-13 obtiveram os melhores resultados de inibição da agregação plaquetária induzida por epinefrina ( $3,3 \pm 1,5\%$  e  $5,7 \pm 1,2\%$ , respectivamente). Os compostos que apresentaram menores médias na agregação induzida por ADP foram L-12 e L-16 ( $9,3 \pm 2,3\%$  e  $22,3 \pm 2,3\%$ , respectivamente). Em relação às DHPs N-feniladas (L-19 a L-29), apenas os compostos L-19 e L-23 não inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP ou epinefrina. Os compostos L-20, L-24, L-28 e L-29 apresentaram diminuição significativa da agregação em relação ao controle negativo na agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina. O composto L-26 apresentou redução significativa apenas na agregação induzida por epinefrina.

**Figura 9** – Efeito das dihidropiridinas (500  $\mu\text{M}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP 10  $\mu\text{M}$ ).



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

**Figura 10** – Efeito das dihidropiridinas (500  $\mu$ M) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina (EPI - 5  $\mu$ g/mL).



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

#### 5.4 ATIVIDADE DAS DHPS SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Como pode ser observado na Tabela 3, nenhuma das DHPs incluídas no estudo prolongou significativamente os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, os valores de RNI e TTPa razão ficaram entre ou abaixo dos valores de referência, sugerindo que estas não possuem atividade anticoagulante.

**Tabela 3** - Efeitos das dihidropiridinas (500  $\mu$ M) sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

Tratamento	TP Média $\pm$ DP (s)	RNI	TTPa Média $\pm$ DP (s)	TTPa razão
<b>Controle negativo</b>	16,0 $\pm$ 0,1	1,0	31,7 $\pm$ 0,7	1,0
<b>Controle positivo</b>	>100	-	>100	-
<b>L-11</b>	16,9 $\pm$ 0,2	1,1	30,6 $\pm$ 0,9	1,0
<b>L-12</b>	16,1 $\pm$ 0,1	1,0	29,9 $\pm$ 0,5	0,9
<b>L-13</b>	12,9 $\pm$ 0,8	0,8	28,0 $\pm$ 0,6	0,9
<b>L-14</b>	14,8 $\pm$ 0,6	0,9	31,4 $\pm$ 0,8	1,0
<b>L-15</b>	14,7 $\pm$ 0,5	0,9	33,2 $\pm$ 0,5	1,0
<b>L-16</b>	15,9 $\pm$ 0,2	1,0	31,3 $\pm$ 0,8	1,0
<b>L-17</b>	17,6 $\pm$ 0,8	1,1	31,6 $\pm$ 0,5	1,0
<b>L-19</b>	-	-	-	-
<b>L-20</b>	-	-	-	-
<b>L-23</b>	-	-	-	-
<b>L-24</b>	14,1 $\pm$ 0,8	0,9	33,1 $\pm$ 0,3	1,0
<b>L-26</b>	-	-	-	-
<b>L-27</b>	-	-	-	-
<b>L-28</b>	15,4 $\pm$ 1,0	1,0	33,4 $\pm$ 1,0	1,0
<b>L-29</b>	-	-	-	-

DP – desvio padrão; Controle negativo – dimetilsulfóxido 0,5% (v/v); Controle positivo – heparina 17 UI/mL de sangue total; RNI – razão normalizada internacional. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão; N = 3. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni. Fonte: A autora.

## 5.5 EFEITO DAS DHPS SOBRE A VIABILIDADE DAS PLAQUETAS HUMANAS

Dos compostos avaliados no presente trabalho, L-12, L-13, L-16 e L-17 apresentaram diminuição significativa da viabilidade plaquetária em relação ao controle negativo, como mostra a Tabela 4. Por outro lado, os compostos L-11, L-14 e L-15 não apresentaram uma redução significativa de plaquetas viáveis em relação ao controle, sugerindo baixo efeito tóxico sobre as plaquetas humanas. Em relação a esse parâmetro, o composto que se apresentou mais promissor foi o L-11 (95,1  $\pm$  0,6).

**Tabela 4** - Efeito tóxico das dihidropiridinas (500  $\mu\text{M}$ ) sobre as plaquetas humanas

<b>Tratamento</b>	<b>Plaquetas viáveis Média <math>\pm</math> DP (%)</b>
<b>Controle Negativo</b>	96,9 $\pm$ 0,6
<b>Controle Positivo</b>	0,01 $\pm$ 0,0*
<b>L-11</b>	95,1 $\pm$ 0,6
<b>L-12</b>	93,6 $\pm$ 0,2*
<b>L-13</b>	91,9 $\pm$ 1,3*
<b>L-14</b>	94,4 $\pm$ 0,2
<b>L-15</b>	94,2 $\pm$ 1,6
<b>L-16</b>	94,1 $\pm$ 0,5*
<b>L-17</b>	93,9 $\pm$ 0,6*

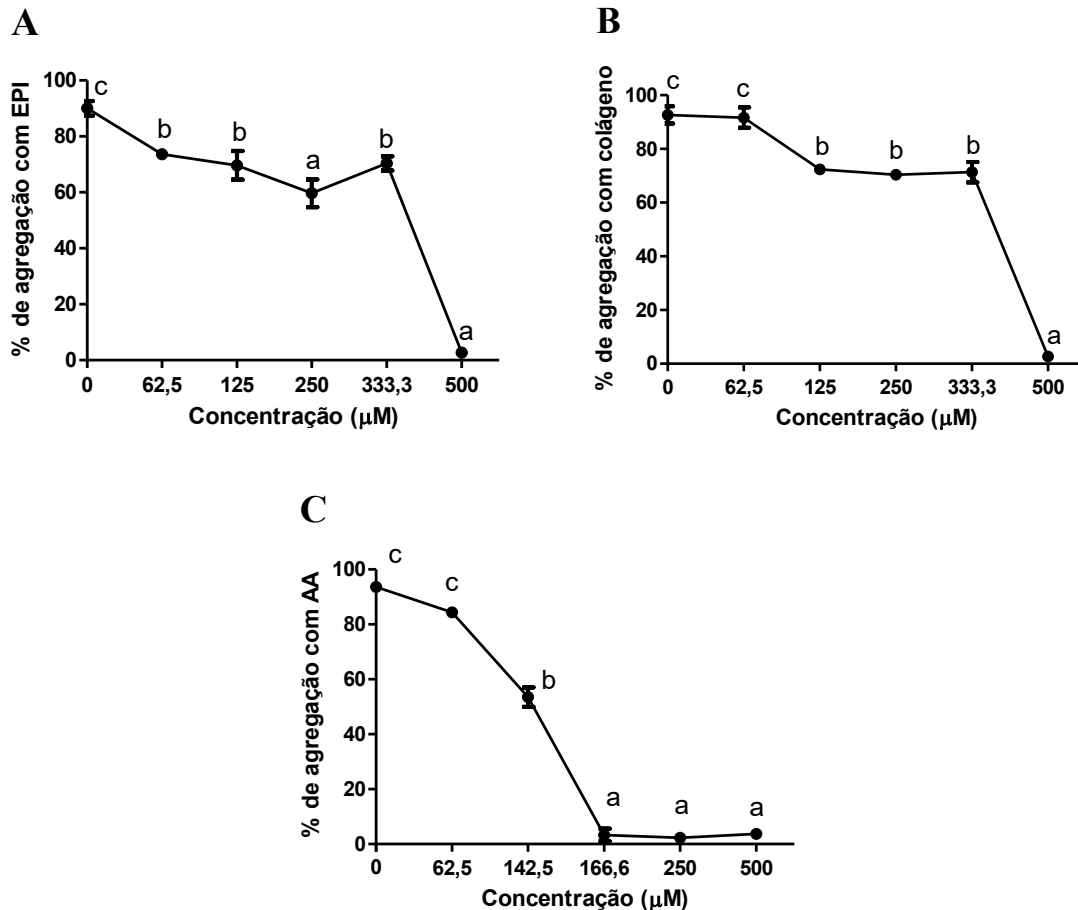
Controle Negativo – dimetilsulfóxido 0,5% (v/v); Controle Positivo (*FIX & PERM*); DP – desvio padrão.

\*Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor  $\leq$  0,05). ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. Fonte: A autora.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DO COMPOSTO L-11 UTILIZANDO EPINEFRINA, COLÁGENO E ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Com o objetivo de verificar se a atividade antiagregante do composto L-11 era dependente de concentração, bem como determinar sua  $CI_{50}$ , foram realizadas diluições seriadas do composto e a agregação foi induzida utilizando-se diferentes agonistas. Conforme a Figura 11, verifica-se que a inibição da agregação plaquetária foi concentração-dependente para todos os agonistas testados. A melhor  $CI_{50}$  foi obtida utilizando-se o AA como agonista (113,4  $\pm$  7,44  $\mu\text{M}$ ), enquanto a epinefrina (334,1  $\pm$  15,74  $\mu\text{M}$ ) e o colágeno (399,4  $\pm$  16,41  $\mu\text{M}$ ) apresentaram  $CI_{50}$  superiores e semelhantes entre si.

**Figura 11** – Curvas de agregação plaquetária induzida por epinefrina, colágeno e ácido araquidônico em função de diferentes concentrações do L-11.



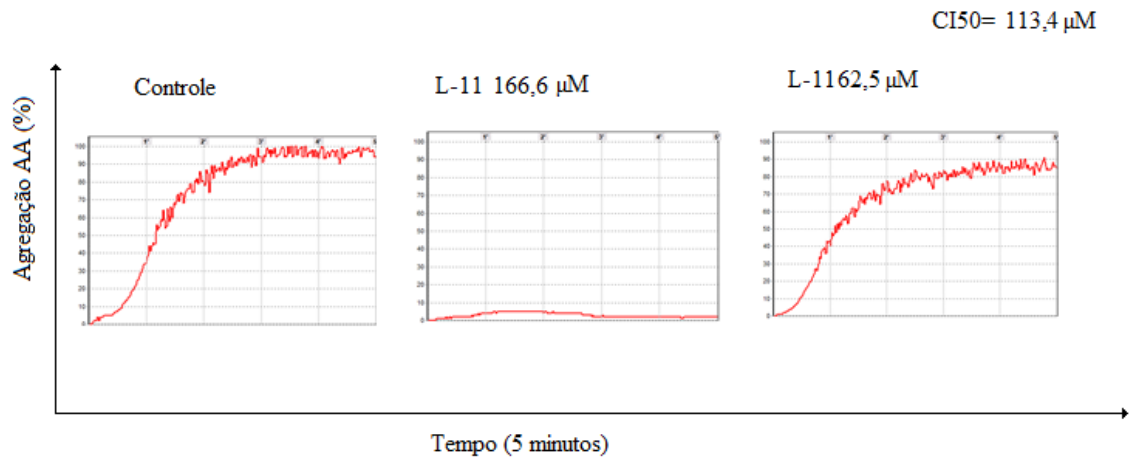
Painel A: Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina (EPI – 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Painel B: Curva de agregação concentração-dependente induzida por colágeno (COL – 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Painel C: Curva de agregação concentração-dependente induzida por ácido araquidônico (AA – 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (N = 3). Letras “a”, “b” e “c” – Pontos identificados com letras iguais não apresentaram diferenças significativas entre si, pontos identificados com letras diferentes tiveram diferenças significativas entre si ( $P \leq 0,05$ ). Foi realizado ANOVA de uma via e um pós-teste de Tukey. Fonte: A autora.

### 5.6.1 Avaliação dos perfis das curvas de agregação em diferentes concentrações do composto L-11

Com o intuito de compreender melhor o mecanismo de ação da atividade antiagregante do L-11, foi realizada a avaliação dos perfis das curvas de agregação em diferentes concentrações do composto e utilizando diferentes agonistas. Como mostra a Figura 12, utilizando o AA como agonista, o composto L-11 na concentração de 166,6  $\mu\text{M}$

conseguiu inibir primeira e segunda ondas. Na concentração de 62,5  $\mu\text{M}$ , nem a primeira nem a segunda onda foram inibidas.

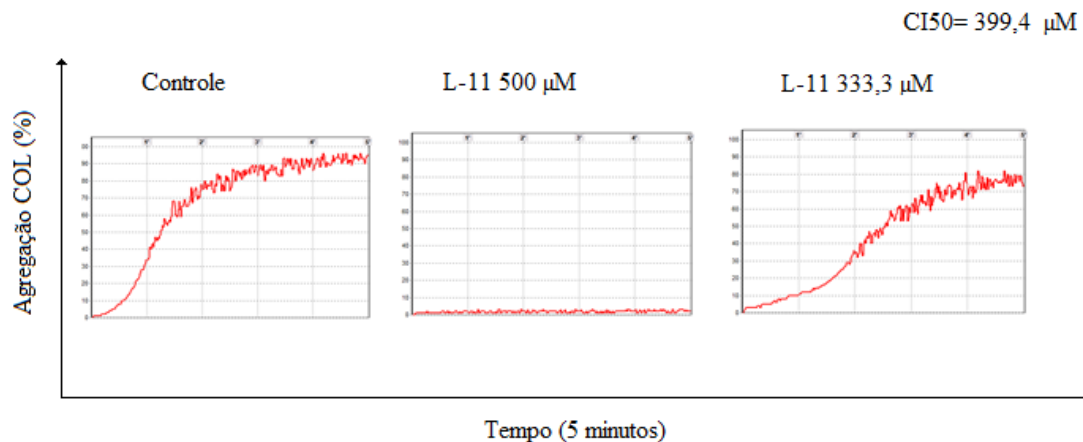
**Figura 12** – Perfil das curvas de agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico com diferentes concentrações do composto L-11.



AA – ácido araquidônico; Controle – DMSO 0,5% (v/v); CI50 – concentração inibitória de 50%. Imagens ilustrativas de experimento em triplicata. Fonte: A autora.

De acordo com a Figura 13, na qual o colágeno foi utilizado como agonista, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , o composto L-11 conseguiu inibir tanto a primeira quanto a segunda onda, já na concentração de 333,3  $\mu\text{M}$ , pode-se observar uma fraca inibição da segunda onda.

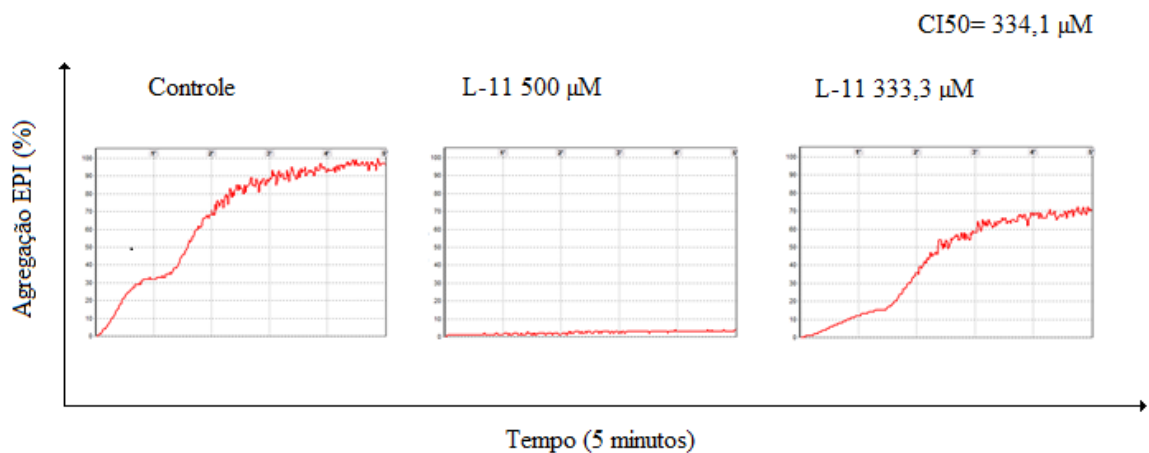
**Figura 13** – Perfil das curvas de agregação plaquetária induzida por colágeno com diferentes concentrações do composto L-11.



COL – colágeno; Controle – DMSO 0,5% (v/v); CI50 – concentração inibitória de 50%. Imagens ilustrativas de experimento em triplicata. Fonte: A autora.

Conforme a Figura 14, utilizando a epinefrina como agonista, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , o composto L-11 conseguiu inibir a primeira e a segunda ondas, já na concentração de 333,3  $\mu\text{M}$ , pode-se observar uma fraca inibição da segunda onda.

**Figura 14** – Perfil das curvas de agregação plaquetária induzida por epinefrina com diferentes concentrações do composto L-11.



EPI – epinefrina; Controle – DMSO 0,5% (v/v); CI50 – concentração inibitória de 50%. Imagens ilustrativas de experimento em triplicata. Fonte: A autora.

## 5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO COMPOSTO L-11

Para avaliar se o efeito antiagregante do composto L-11 é dependente de tempo de incubação, foram realizados testes de agregação incubando as amostras com o composto L-11 na concentração de 333,3  $\mu\text{M}$  nos tempos de 5 e 15 minutos. Utilizando a epinefrina como agregante, não foi observada diminuição significativa da porcentagem de agregação após 15 minutos de incubação quando comparado com a porcentagem obtida após 5 minutos de incubação com o composto. Por outro lado, quando o colágeno foi utilizado como estímulo, houve diminuição significativa da agregação no tempo de incubação de 15 minutos em relação ao tempo de 5 minutos (Tabela 5), sugerindo que houve uma atividade dependente do tempo de incubação.



**Tabela 5** – Efeito do Composto L-11 (333,3  $\mu$ M) sobre a agregação plaquetária em diferentes tempos de incubação (5 e 15 minutos).

<b>Tratamento</b>	<b>Epinefrina Média <math>\pm</math> DP (%)</b>	<b>Colágeno Média <math>\pm</math> DP (%)</b>
<b>Controle (DMSO)</b>	88,5 $\pm$ 0,7	94,5 $\pm$ 0,7
<b>L-11 (5 minutos)</b>	69,0 $\pm$ 1,4	73,5 $\pm$ 0,7
<b>L-11 (15 minutos)</b>	77,5 $\pm$ 0,7*	68,0 $\pm$ 1,4*

DP – desvio padrão; DMSO- dimetilsulfóxido 0,5% (v/v); Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (N = 2); \*Diferença significativa em relação ao tempo de 5 minutos. Teste t de *Student* para amostras independentes.

Fonte: A autora.

## 5.8 EXPRESSÃO MEMBRANAR DE P-SELECTINA

Para verificar se o composto L-11 era capaz de inibir a ativação plaquetária, foi avaliada a expressão de P-selectina (CD62) marcando as plaquetas com anti-CD62P. Utilizando AA como agonista, a inibição da expressão membranar de P-selectina foi de 76,47%.

## 6 DISCUSSÃO

Hemostasia é o processo que garante a manutenção do fluxo sanguíneo em condições fisiológicas normais e impede a perda significativa de sangue após a lesão vascular (DÁVILA SINAÍ DEL CARMEN *et al.*, 2019). Portanto, a hemostasia normal depende de um equilíbrio entre a trombose e a hemorragia, por meio de processos pró e antitrombóticos (ZAIDI; GREEN, 2019).

Caso haja alguma desregulação nesses processos, pode ocorrer a formação de um trombo indevido, fenômeno conhecido como trombose (MA *et al.*, 2020). A trombose consiste no aparecimento de um coágulo em algum vaso sanguíneo devido à formação excessiva de trombina e a sua manifestação mais frequente envolve as DCVs (MOUMNEH; PENALOZA; ROY, 2018).

Apesar de serem utilizados há décadas e de os estudos mostrarem eficácia clínica e capacidade de reduzir a mortalidade de diversas DCVs, os medicamentos antitrombóticos apresentam limitações. Portanto, ainda se faz necessária a realização de estudos que procurem descobrir compostos capazes de auxiliar na prevenção e tratamento dessas doenças (HIRSH; EIKELBOOM; CHAN, 2019). Diante disso, o presente estudo investigou a ação de uma série de DHPs sintéticas sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea. DHPs fazem parte da classe dos bloqueadores de canal de cálcio e são comumente utilizadas no tratamento de hipertensão. Um estudo anterior demonstrou que essa classe possui efeitos inibitórios na atividade plaquetária, porém seus mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados (SUNKEL *et al.*, 1988).

No presente trabalho, previamente aos ensaios *in vitro*, foram realizados testes *in silico* a fim de prever parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), a semelhança com medicamentos já disponíveis comercialmente e a compatibilidade química medicinal dos compostos avaliados no estudo. Os ensaios *in silico* avaliam estruturas químicas de compostos utilizando a regra dos cinco, criada por Lipinski, e prediz como a estrutura das entidades químicas pode influenciar na solubilidade e na permeabilidade de fármacos administrados por via oral. Para novos candidatos a medicamentos, os ensaios teóricos que relacionam a farmacocinética são de extrema importância em estágios iniciais da pesquisa (LIPINSKI *et al.*, 1997). Considerando a terapia antitrombótica, sabe-se que a adesão ao tratamento se dá mais facilmente por via oral, porém existem limitações nos medicamentos disponíveis atualmente. Portanto, a predição de

biodisponibilidade oral é fundamental na pesquisa de novos medicamentos antitrombóticos (MAIER; DUNCAN; HILL, 2016).

A regra dos cinco é baseada em propriedades calculadas em milhares de fármacos e leva esse nome porque os pontos de corte para os parâmetros estudados foram próximos de cinco ou múltiplos de cinco. Nomeadamente, esses parâmetros são peso molecular, Log P, número de doadores e número de receptores de ligação de hidrogênio. Portanto, a regra dos cinco afirma que boa absorção e permeabilidade são mais prováveis quando: existem menos de cinco doadores de hidrogênio (soma de OH e NH na molécula); existem menos de dez receptores de ligação de hidrogênio (soma de O e N na molécula); o peso molecular é inferior a 500 g/mol; e Log P inferior a 5 (ou MLog P inferior a 4,15) (LIPINSKI *et al.*, 1997). Complementando os parâmetros estudados por Lipinski, Veber considera dois outros critérios para a boa biodisponibilidade oral de fármacos, sendo: dez ou menos ligações rotacionáveis na molécula e uma área de superfície polar igual ou inferior a 140 Å (VEBER *et al.*, 2002). A violação de mais de um dos parâmetros descritos acima pode estar relacionada a uma má absorção (LIPINSKI, *et al.*, 1997).

Pela análise dos resultados e de acordo com a Tabela 3, os compostos L-16, L-26, L-27 e L-29 apresentaram uma violação cada. Em todos eles, o número de ligações rotacionáveis foi igual ou superior a dez. Segundo Veber, um maior número de ligações rotacionáveis está relacionado a uma diminuição da rigidez molecular, portanto, um número menor dessas ligações está associado a uma melhor biodisponibilidade oral. No geral, moléculas com peso superior a 500 g/mol têm uma maior contagem de ligações rotativas (VEBER *et al.*, 2002). Todos os compostos utilizados no estudo tinham peso molecular inferior a 500 g/mol e nem todos os que violaram a regra estavam entre os mais pesados. Apesar de os compostos citados acima terem violado um parâmetro, apenas uma violação não inviabiliza seu uso, portanto, pode-se considerar que todos os compostos da série apresentaram biodisponibilidade oral teórica promissora.

Além da avaliação de biodisponibilidade oral, foi realizada a análise teórica de toxicidade dos compostos com base em suas estruturas. Pensando em futuros fármacos administrados por via oral, é importante que a atividade tóxica não seja significativa e que haja o mínimo de efeitos adversos. A predição da toxicidade, realizada através de estudos *in silico*, tem servido como complemento para estudos *in vitro* e *in vivo*. Como mostra a Tabela 4, os compostos utilizados nesse estudo apresentaram uma predição teórica de toxicidade promissora, uma vez que todos apresentaram baixo risco para os quatro parâmetros avaliados.

Visto que todos os compostos apresentaram risco baixo para os parâmetros de toxicidade avaliados *in silico*, iniciaram-se os estudos *in vitro*. O primeiro ensaio *in vitro* foi o de agregação plaquetária, no qual todos os compostos foram triados na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , e, inicialmente, utilizou-se como agonistas ADP e epinefrina. Todas as DHPs que não eram N-feniladas (L-11 a L-17) inibiram significativamente a agregação induzida pelos dois agonistas empregados na triagem. Destes, apenas os compostos L-14 e L-17 tiveram uma porcentagem de agregação maior do que 50% quando ADP foi utilizado como agonista. Dos compostos N-fenilados (L-19 a L-29), apenas o L-19 e o L-23 não inibiram significativamente a agregação com nenhum dos agonistas. No entanto, ressalta-se que as DHPs N-feniladas apresentaram menor capacidade antiagregante do que as não feniladas, principalmente quando a epinefrina foi utilizada como agonista. Adicionalmente, várias das DHPs N-feniladas apresentaram porcentagens de agregação superiores ou muito próximas a 50% e, por isso, não foram consideradas promissoras, uma vez que as suas  $\text{CI}_{50}$  seriam muito elevadas. Durante os experimentos, observou-se que algumas das DHPs N-feniladas apresentaram problemas de solubilidade em DMSO, PRP ou PPP e, por isso, acredita-se que alguns dos resultados apresentados nas Figuras 3 e 4 possam estar subestimados. Devido a essa atividade pouco promissora e aos aparentes problemas de solubilidade, não foram realizadas mais investigações com as DHPs N-feniladas envolvendo as plaquetas.

Shih *et al.* (2014) avaliaram o efeito antiagregante e os possíveis mecanismos de ação do nifedipino, um bloqueador de canal de cálcio semelhante às DHPs. Os mesmos autores observaram que a atividade inibitória do nifedipino pode estar relacionada com o bloqueio de NF $\kappa$ B, inibindo a agregação plaquetária por meio da supressão da cascata de PLA<sub>2</sub>-TxA<sub>2</sub> e da expressão de GPIIb/IIIa. Outro possível mecanismo do nifedipino é o aumento da produção de NO/cGMP/PKG1 que, por meio da modulação dos filamentos de actina, ativação de integrina e diminuição da mobilização de cálcio, inibe a agregação plaquetária. No estudo de Shih *et al.* (2014), foi observado que o nifedipino inibiu a agregação plaquetária induzida por AA e a produção de TxA<sub>2</sub> diminuiu de forma dependente da concentração. O nifedipino e outros bloqueadores de canal de cálcio aumentam a atividade dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma- $\beta$ / $\gamma$  (PPARs- $\beta$ / $\gamma$ ) e os PPARs, por sua vez, são reguladores negativos de NF $\kappa$ B, diminuem a mobilização de cálcio, podem inibir a liberação de AA, diminuindo a formação de TxA<sub>2</sub>, podendo estar diretamente relacionados com o mecanismo de ação do nifedipino (SHIH *et al.*, 2014). O efeito antiagregante observado nos compostos avaliados no presente trabalho pode ter relação com os mecanismos

de ação propostos por Shih *et al.* (2014), uma vez que o nifedipino e as DHPs deste estudo fazem parte do mesmo grupo químico.

Posteriormente aos estudos de agregação, foi realizada uma triagem para avaliar se os compostos apresentavam atividade anticoagulante, utilizando-se os testes de TP e TTPa, que avaliam as vias extrínseca e intrínseca da coagulação, respectivamente (NIERDERDÖCKL *et al.*, 2016). Devido aos aparentes problemas de solubilidade das DHPs N-feniladas, a atividade de alguns compostos sobre a coagulação não foi avaliada.

Como pode ser visto na Tabela 3, nenhum dos compostos prolongou significativamente os tempos de TP e TTPa. Além dos resultados de TP e TTPa em segundos, foram calculados o RNI e a razão TTPa dos compostos. O RNI é obtido pela razão entre TP do composto/TP controle, posteriormente elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI), fornecido pelo fabricante. Em indivíduos saudáveis e que não fazem uso de terapia anticoagulante, o RNI ideal é entre 1,0 e 1,3 (SHIKDAR; BHATTACHARYA, 2018). A razão de TTPa é calculada pela razão TTPa do composto/TTPa do controle e seus valores de referência variam entre 1,0 e 1,5 para indivíduos saudáveis que não fazem uso de anticoagulantes (GREINACHER *et al.*, 2000). Os valores de RNI no estudo ficaram entre 0,8 e 1,1 e os resultados das razões de TTPa foram 0,9 e 1,0, menores ou dentro do valor de referência, sugerindo que os compostos não apresentam atividade anticoagulante. A ausência de atividade anticoagulante associada a uma atividade antiagregante é considerada promissora, pois a associação das duas atividades em um único composto poderia aumentar em muito o risco de eventos hemorrágicos graves ou fatais, um dos efeitos adversos mais relevante apresentado pelos atuais medicamentos antitrombóticos comercialmente disponíveis.

Kumar *et al.* (2011) também avaliaram a atividade anticoagulante de dois grupos de derivados de DHPs e não observaram prolongamento do TP ou do TTPa no primeiro grupo, as estruturas químicas deste grupo avaliado por Kumar *et al.* são semelhantes às dos compostos utilizados neste trabalho, podendo ser uma justificativa para a ausência de atividade anticoagulante. Em contrapartida, no estudo de Kumar *et al.* (2011), foi observado aumento tanto do TP quanto do TTPa nos ensaios com compostos análogos de DHPs do segundo grupo avaliado, durante sua síntese, foi adicionado aos compostos um grupo enxofre, que pode ser o responsável pelo aumento da atividade anticoagulante. O composto com maior atividade anticoagulante tinha um anel furil, que pode justificar a melhora desta atividade

(KUMAR *et al.*, 2011). Nenhum dos compostos utilizados neste estudo tem em sua estrutura enxofre ou anel furil, o que pode explicar a ausência da atividade anticoagulante.

Em um estudo realizado por Anwar *et al.* (2020), observou-se que as DHPs sintetizadas por eles, utilizadas na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , causaram um dano mínimo às células humanas. Da mesma forma, com o intuito de avaliar se os compostos eram tóxicos às plaquetas humanas, foi realizado o teste de viabilidade plaquetária com Azul de *Trypan*. As plaquetas que permaneceram com seu citoplasma branco ou claro foram consideradas viáveis e as que tinham citoplasma azul, inviáveis. Conforme a Tabela 6, quatro compostos (L-12, L-13, L-16 e L-17) apresentaram diminuição significativa da viabilidade plaquetária quando comparadas com o controle negativo, portanto, apresentaram algum sinal de toxicidade. Os demais compostos (L-11, L-14 e L-15) não apresentaram redução significativa no número de plaquetas viáveis, sugerindo baixa toxicidade às plaquetas. Apesar de a maioria dos compostos apresentarem diminuição significativa em relação ao controle negativo, essas diferenças não são consideradas clinicamente relevantes, uma vez que a maior diferença observada foi de 5%. Em indivíduos saudáveis, a contagem plaquetária varia de 150 a 350 x 10<sup>9</sup> plaquetas/L e, portanto, mesmo que 5% das plaquetas tenham morrido, essa morte não é o suficiente para impactar nos ensaios de agregação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016). Portanto, considerando uma contagem plaquetária normal, o maior número de plaquetas inviáveis de acordo com o teste foi de 17,5 x 10<sup>9</sup> plaquetas/L.

Considerando os resultados discutidos acima, o composto L-11 mostrou-se o mais promissor, uma vez que apresentou bom potencial antiagregante, ausência de atividade anticoagulante e seu resultado no teste de viabilidade plaquetária ficou entre os melhores. Nos estudos *in silico*, essa DHP não demonstrou nenhuma violação aos critérios avaliados. Portanto, o L-11 foi o composto selecionado para dar continuidade aos ensaios.

Após verificar que o composto L-11 inibiu significativamente a agregação com ADP e epinefrina, e não apresentou toxicidade nos testes *in silico* e *in vitro*, foi avaliado se seu efeito antiagregante era dependente de concentração e posteriormente foi calculada a CI<sub>50</sub> do composto para cada agonista utilizado. Conforme a Figura 11, pode-se observar que a inibição da agregação plaquetária foi concentração-dependente para todos os agonistas testados. A melhor CI<sub>50</sub> foi obtida utilizando-se o AA como agonista (113,4 ± 7,44  $\mu\text{M}$ ), enquanto a epinefrina (334,1 ± 15,74  $\mu\text{M}$ ) e o colágeno (399,4 ± 16,41  $\mu\text{M}$ ) apresentaram CI<sub>50</sub> superiores e semelhantes entre si.

Como se observa na Figura 12, quando as amostras foram estimuladas com AA, o composto L-11 inibiu completamente a primeira e a segunda ondas quando utilizado na concentração de 166,6  $\mu\text{M}$ , ou seja, pode-se dizer que não houve formação de agregados plaquetários.

Na concentração de 62,5  $\mu\text{M}$ , o composto L-11 inibiu minimamente a segunda onda, portanto, teve mínima atuação na amplificação de sinal das plaquetas e na liberação de grânulos. Quando se utilizou epinefrina e colágeno como agonistas, segundo as Figuras 13 e 14, o composto L-11 foi capaz de inibir completamente as duas ondas. Por outro lado, utilizando os mesmos agonistas, o composto L-11 na concentração de 333,3  $\mu\text{M}$  conseguiu inibir apenas a segunda onda, diminuindo a amplificação de sinal das plaquetas e liberação de grânulos.

A primeira onda de agregação representa a transdução de sinal, ou seja, com a adição de um agonista, as plaquetas são ativadas, mudam sua forma de discoide para esférica e iniciam a formação de agregados plaquetários, nesse momento, a transmissão de luz aumenta e a onda começa a ser formada. Quando o estímulo do agonista é forte, acontece a formação da segunda onda, que representa a amplificação de sinal das plaquetas, o momento em que os grânulos plaquetários são liberados ativando o restante das plaquetas, quanto mais agregadas as plaquetas ficam, maior a transmissão de luz.

Apenas quando o AA foi utilizado como agonista se observou inibição da primeira e da segunda onda em todas as concentrações utilizadas, indicando inibição da ativação plaquetária, portanto, assim como no estudo de Shih *et al.*, citado anteriormente, acredita-se que a via utilizada para inibição plaquetária é a via do AA.

O AA é o principal ácido graxo da membrana celular das plaquetas, mas não é o responsável pelo estímulo plaquetário. Quando livre, o AA é catalisado pela ciclo-oxigenase 1 (COX1) e, depois de algumas reações, ocorre a formação de tromboxano A (TxA), seguido de TxA2. Por ter um receptor acoplado à proteína G, o tromboxano é o responsável por estimular a ativação plaquetária, a ligação do TxA2 ao seu receptor tem como consequências a mudança de forma das plaquetas, agregação e secreção de grânulos plaquetários (BIJAK; SALUK-BIJAK, 2017). Portanto, inibindo a via do AA, não existe a formação de TxA2 e a ativação plaquetária é reduzida ou totalmente inibida.

Outro parâmetro que foi avaliado era se a atividade de L-11 era dependente do tempo de incubação. Quando se utilizou epinefrina como agonista, houve um aumento significativo da agregação após 15 minutos de incubação quando comparado com a incubação de 5 minutos, enquanto quando o colágeno foi empregado como estímulo, houve uma diminuição significativa entre os tempos. Apesar de haver diferenças estatisticamente significativas, ambos não foram considerados clinicamente relevantes, pois, nas condições do modelo experimental utilizado, diferenças de até 10% podem ser consideradas replicatas.

Por fim, foi avaliada a ativação plaquetária por meio da citometria de fluxo. O marcador utilizado foi o CD62P, considerado padrão ouro para esta análise (CHO *et al.*, 2020). Para avaliar melhor a hipótese do mecanismo de ação do composto L-11, o AA foi utilizado como agonista na citometria de fluxo e apresentou uma inibição da expressão membranar de P-selectina de 76,47%. Considerando os estudos de Shih *et al.*, bem como os a análise dos perfis das curvas de agregação, acredita-se que esse resultado corrobora a hipótese de que a via utilizada pelo composto L-11 para inibição da ativação plaquetária seja a via do AA.



## 7 CONCLUSÃO

Após a compilação dos resultados, pode-se concluir que:

- As DHPs avaliadas neste trabalho apresentaram baixa toxicidade e boa disponibilidade oral nos testes *in silico*, podendo ser consideradas boas candidatas a futuros fármacos;
- Nos testes de agregação *in vitro* realizados com epinefrina e ADP, as DHPs apresentaram boa atividade antiagregante com ambos os agonistas;
- Nenhuma DHP apresentou atividade anticoagulante promissora;
- Considerando o teste de toxicidade *in vitro*, os compostos L-11, L-14 e L-15 apresentaram os menores efeitos tóxicos sobre as plaquetas humanas;
- Entre as DHPs, o composto L-11 se mostrou o mais promissor como agente antitrombótico utilizando ADP e epinefrina, também apresentou boa inibição plaquetária quando colágeno e AA foram utilizados como agonistas;
- A atividade do composto L-11 não demonstrou ser dependente de tempo de incubação utilizando colágeno e epinefrina como estímulos;
- Calculando as  $CI_{50}$  com epinefrina, colágeno e AA, o melhor resultado foi obtido com o AA;
- Avaliando a inibição da ativação plaquetária, o composto L-11 apresentou alta capacidade de inibir a expressão da P-selectina utilizando AA como agonista.

Considerando os resultados, todas as DHPs possuem boa atividade antiagregante, sendo o composto L-11 o de melhor potencial. Avaliando este composto individualmente, teve boa inibição plaquetária com todos os agonistas e seu mecanismo de ação parece estar relacionado à inibição da via do ácido araquidônico.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, Monica; AGGARWAL, Brooke; RAO, Jyothi. Integrative Medicine for Cardiovascular Disease and Prevention. **Medical Clinics Of North America**, [S.L.], v. 101, n. 5, p. 895-923, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2017.04.007>.
- AIRD, William C.. Endothelium and Hemostasis. In: AIRD, William C.. **Endothelial Cells in Health and Disease**. Boca Raton: Crc Press, 2013. p. 40-54.
- ANWAR, Ayaz *et al.*... Synthetic Dihydropyridines as Novel Antiacanthamoebic Agents. **Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 841-847, 6 nov. 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1573406415666190722113412>.
- AUSTIN, Steven K.. Haemostasis. **Medicine**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 204-208, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.01.013>.
- BIJAK, Michal; SALUK-BIJAK, Joanna. Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-8, 10 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1897-7>.
- BORN, G. V. R.; CROSS, M. J.. The aggregation of blood platelets. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 168, n. 1, p. 178-195, 1 ago. 1963. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007185>.
- BOYCE, Sara; LWALEED, Bashir; KAZMI, Rashid. Homeostasis of Hemostasis: the role of endothelium. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**, [S.L.], v. 41, n. 06, p. 549-555, 13 ago. 2015. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1556586>.
- CAMPOS, Kevin R. *et al.* The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, [S.L.], v. 363, n. 6424, p. 527-532, 18 jan. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aat0805>.
- CARMEN, Rodríguez Dávila Sinaí del *et al.* Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica. **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, Guadalajara, p. 227-233, nov. 2019.
- CASSAR, K *et al.* Platelet activation is increased in peripheral arterial disease. **Journal Of Vascular Surgery**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 99-103, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0741-5214\(03\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0741-5214(03)00129-0).
- CHAPIN, John C.; HAJJAR, Katherine A.. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 17-24, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>.
- CIMMINO, Giovanni; GOLINO, Paolo. Platelet Biology and Receptor Pathways. **Journal Of Cardiovascular Translational Research**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 299-309, 10 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12265-012-9445-9>.

CHO, Youn Joung *et al.* Effects of remote ischemic preconditioning on platelet activation and reactivity in patients undergoing cardiac surgery usiy-passlmonaray-passass: a randomized controlled trial. **Platelets**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 123-131, 13 dez. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2020.1856362>.

CHOU, Tz-Chong. New mechanisms of antiplatelet activity of nifedipine, an L-type calcium channel blocker. **Biomedicine**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 17-24, 18 nov. 2014. China Medical University. <http://dx.doi.org/10.7603/s40681-014-0024-z>.

COUGHLIN, S. R.. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 1800-1814, ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>.

FRONTROTH, Juan Pablo. Light Transmission Aggregometry. **Haemostasis**, [S.L.], p. 227-240, 2013. Humana Press. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8\\_17](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_17).

FRYDMAN, G.H.; PATE, K.A. Metcalf; VITSKY, A.. Platelets and Hemostasis. **Comprehensive Toxicology**, [S.L.], p. 60-113, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64247-2>.

GOMIS-TENA, Julio *et al.* When Does the IC50 Accurately Assess the Blocking Potency of a Drug? **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 1779-1790, 27 fev. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01085>.

GREEN, David. Coagulation cascade. **Hemodialysis International**, [S.L.], v. 10, n. 52, p. 52-64, out. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>.

GREINACHER, Andreas *et al.* Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aptt range. **Blood**, [S.L.], v. 96, n. 3, p. 846-851, 1 ago. 2000. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v96.3.846>.

GREMME, Thomas; MICHELSON, Alan D.; FRELINGER, Andrew L.. In Vivo and protease-activated receptor-1-mediated platelet activation in patients presenting for cardiac catheterization. **Platelets**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 308-316, 10 nov. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2015.1095876>.

HIRSH, Jack; EIKELBOOM, John W; CHAN, Noel C. Fifty years of research on antithrombotic therapy: achievements and disappointments. **European Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 70, p. 1-7, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2019.10.023>.

HOLINSTAT, Michael. Normal platelet function. **Cancer And Metastasis Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 195-198, jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-017-9677-x>.

JENNE, C. N.; URRUTIA, R.; KUBES, P.. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **International Journal Of Laboratory Hematology**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 254-261, 17 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12084>.

JURK, Kerstin; KEHREL, Beate e. Platelets: physiology and biochemistry. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**, [S.L.], v. 31, n. 04, p. 381-392, ago. 2005. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-916671>.

KAPLAN, Zane S.; JACKSON, Shaun P.. The Role of Platelets in Atherothrombosis. **Hematology**, [S.L.], v. 2011, n. 1, p. 51-61, 10 dez. 2011. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.51>.

KLUFT, Cornelis; BURGGRAAF, Jacobus. Introduction to haemostasis from a pharmacodynamic perspective. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 72, n. 4, p. 538-546, 9 set. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03946.x>.

KUMAR, R. Surendra *et al.* Synthesis and anticoagulant activity of a new series of 1,4-dihydropyridine derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 804-810, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.12.006>.

LEVINE, Dana N.; BROOKS, Marjory B.. Immune thrombocytopenia (ITP): pathophysiology update and diagnostic dilemmas. **Veterinary Clinical Pathology**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 17-28, 19 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12774>.

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. 23, n. 1-3, p. 3-25, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00423-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00423-1).

MA, Ning *et al.* Plasma metabonomics and proteomics studies on the anti-thrombosis mechanism of aspirin eugenol ester in rat tail thrombosis model. **Journal Of Proteomics**, [S.L.], v. 215, p. 103631, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103631>.

MAIER, Cheryl L. *et al.* Pharmacogenetics in Oral Antithrombotic Therapy. **Clinics In Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 461-472, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2016.05.002>.

MEGA, Jessica L; SIMON, Tabassome. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. **The Lancet**, [S.L.], v. 386, n. 9990, p. 281-291, jul. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60243-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60243-4).

MEIJDEN, Paola E. J. van Der; HEEMSKERK, Johan W. M.. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 166-179, 14 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>.

MEREDITH, Peter A.; ELLIOTT, Henry L.. Dihydropyridine calcium channel blockers: basic pharmacological similarities but fundamental therapeutic differences. **Journal Of Hypertension**, Scotland, v. 22, n. 1, p. 1641-1648, mar. 2004.

MOUMNEH, T.; PENALOZA, A.; ROY, P.M.. Trombosis venosa profunda. **Emc - Tratado de Medicina**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-6, mar. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1636-5410\(17\)87867-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1636-5410(17)87867-3).

MUKHOPADHYAY, Subhradip; *et al.* Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, n. 13, p. 1-14, 14 jun. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01348>.

NAKAHATA, Norimichi. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 118, n. 1, p. 18-35, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.01.001>.

NIEDERDÖCKL, J. *et al.* Point-of-care PT and aPTT in patients with suspected deficiencies of coagulation factors. **International Journal Of Laboratory Hematology**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 426-434, 7 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12519>.

OLIVEIRA, Gláucia Maria Moraes de *et al.* Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 118, n. 1, p. 115-373, jan. 2022. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.36660/abc.20211012>.

POLLO, Luiz A.e. *et al.* Synthesis and in vitro evaluation of Ca<sup>2+</sup> channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*: sar analysis. **Parasitology International**, [S.L.], v. 66, n. 6, p. 789-797, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2017.08.005>.

RAUCH, A.; PARIS, C.. Hemostasia primaria. **Emc - Tratado de Medicina**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-12, mar. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1636-5410\(17\)87866-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1636-5410(17)87866-1).  
RENDU, Francine; BROHARD-BOHN, Brigitte. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 261-273, jan. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09537100120068170>.

SHAHIDI, Mino. Thrombosis and von Willebrand Factor. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 285-306, 2016. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_122](http://dx.doi.org/10.1007/5584_2016_122).

SHIH, Ching-Yu *et al.* Antiplatelet activity of nifedipine is mediated by inhibition of NF-κB activation caused by enhancement of PPAR-β/-γ activity. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 171, n. 6, p. 1490-1500, mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12523>.

SHIKDAR S., VASHISHT R, BHATTACHARYA P. T. **International Normalized Ratio (INR)**. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021. PMID: 29939529.

STEVENS, Bryce *et al.* The Economic Burden of Heart Conditions in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 1, n. 111, p. 29-36, 2018. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20180104>.

SUNKEL, Carlos E. *et al.* Synthesis, Platelet Aggregation Inhibitory Activity, and in Vivo Antithrombotic Activity of New 1,4-Dihydropyridines. **Journal Of Medicinal Chemistry**, Madrid, v. 31, n. 10, p. 1886-1890, nov. 1988.

TOMAIUOLO, Maurizio; BRASS, Lawrence F.; STALKER, Timothy J.. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. **Interventional Cardiology Clinics**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-12, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.iccl.2016.08.001>.

THOMAS, Steven G.. The Structure of Resting and Activated Platelets. **Platelets**, [S.L.], p. 47-77, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813456-6.00003-5>.

VEBER, Daniel F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 11 maio 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm020017n>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 11 jun. 2021.

ZAIDI, Abbas; GREEN, Laura. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 152-158, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.01.005>.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

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

**Pesquisador:** Ana Carolina Rabello de Moraes

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 12353019.0.0000.0121

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.025.174

#### Apresentação do Projeto:

Projeto aprovado por este CEP em 03/07/2019, pelo parecer nro. 3.433.945.

#### Objetivo da Pesquisa:

Essencialmente os mesmos descritos no parecer 3.433.945 de 03/07/2019. A alteração proposta através desse emenda restringe-se à inclusão de compostos sintéticos e semissintéticos no estudo, além dos compostos naturais já presentes na versão aprovada.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos e analisados no parecer 3.433.945 de 03/07/2019.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Descritos e analisados no parecer 3.433.945 de 03/07/2019.

Nova declaração de anuência do HU-UFSC foi apresentada para esta emenda.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata a presente emenda de solicitação de inclusão de compostos sintéticos e semissintéticos no estudo, além dos compostos naturais já informados no projeto aprovado. Segundo os pesquisadores "as modificações realizadas no presente projeto não alterará a forma de obtenção

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88 040-400  
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
 Telefone: (48)3721-8004 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 4.025.174

das amostras de sangue dos participantes. As únicas modificações nos métodos são a inclusão dos compostos semissintéticos e sintéticos nas incubações dos ensaios já apresentados na versão original do projeto". Nova declaração do HU, novo projeto e novo TCLE foram apresentados ressaltando as alterações.

**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	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_154795_8_É1.pdf	29/04/2020 15:24:37		Acelto
Outros	carta_solicitacao_emenda_CEP_29042020_assinado.pdf	29/04/2020 15:20:42	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Projeto_040_Declaracao_de_Ciencia_da_Institulcao_Emenda.pdf	29/04/2020 15:13:31	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_hemostasia_produtos_naturais_2v_emenda_28042020.pdf	29/04/2020 15:10:59	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_comite_etica_hemostasia_produtos_naturais_emenda_28042020.pdf	29/04/2020 15:09:03	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	16/04/2019 17:46:23	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 13 de Maio de 2020

Assinado por:  
**Maria Luiza Bazzo**  
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br