

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Bioquímica Médica

# **Caracterização farmacológica e estudo do mecanismo de ação antihemostático de derivados acilhidrazônicos**

Flávia Serra Frattani Ferreira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química  
Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do  
Rio de Janeiro visando obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Bioquímica Médica

# **Caracterização farmacológica e estudo do mecanismo de ação antiemostático de derivados acilhidrazônicos**

Flávia Serra Frattani Ferreira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Orientação: Prof. Russolina B. Zingali**  
Rio de Janeiro  
2009

# **Caracterização farmacológica e estudo do mecanismo de ação antiemostático de derivados acilhidrazônicos**

**Flávia Serra Frattani Ferreira**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

## **Banca Examinadora:**

### **Prof. Carlos Termignoni**

Professor Associado do Departamento de Bioquímica - UFRGS  
Examinador

### **Prof.<sup>a</sup> Ana Luisa Palhares de Miranda**

Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia - UFRJ  
Examinador

### **Prof. Aurélio Vicente Graça de Souza**

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – CCS - UFRJ  
Examinador

### **Prof. André Lopes Fuly**

Professor Adjunto do Instituto de Biologia – UFF  
Suplente Externo

### **Prof.<sup>a</sup> Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek**

Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica – CCS - UFRJ  
Revisor e Suplente Interno

### **Prof.<sup>a</sup> Russolina B. Zingali**

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – CCS - UFRJ  
Orientador

Este trabalho foi realizado no “Laboratório de Hemostase e Venenos” do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), PROCAD-CAPES e IFS. A doutoranda foi bolsista do CNPq durante a realização da tese.

Orientação: Prof Russolina B. Zingali  
Instituto de Bioquímica Médica – CCS - UFRJ

FRATTANI, Flávia Serra Ferreira

Caracterização farmacológica e estudo do mecanismo de ação antihemostático de derivados acilhidrazônicos

Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

xxii, 142f

Orientador: Russolina Benedeta Zingali

Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Química Biológica)

Referências Bibliográficas: f. 125-142.

1. Trombose. 2. Tromboembolia pulmonar. 3. Plaquetas. 4. Receptores plaquetários. 5. PAR. 6. Derivados acilhidrazônicos. 7. Drogas anti-plaquetárias.

I. Zingali, Russolina Benedeta II. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Bioquímica médica – Programa de Pós-graduação em Química Biológica

III. Títulos

## ***À minha família***

*Dedico esta tese à minha família por toda ajuda e compreensão que sempre tiveram e por me cobrirem de amor e carinho e com isso renovarem minhas forças.*

*“A mente que se abre a uma  
nova idéia jamais voltará ao seu  
tamanho original.”*

***Albert Einstein***

# ***Agradecimentos***

A minha orientadora Lina Zingali por proporcionar as melhores condições de trabalho e por sempre conseguir algum horário para me atender mesmo estando tão atarefada com projetos, relatórios e problemas a resolver.

Ao Professor Robson Monteiro pela enorme paciência, por sempre estar pronto a ajudar, mesmo não estando participando diretamente do projeto e por todas as dúvidas solucionadas.

A Professora Helena Carla Castro por começar a minha orientação no período de iniciação científica, pelo tempo em que passou ao meu lado e por me dar estímulo e incentivo para seguir a carreira acadêmica.

A Professora Vivian por ter aceitado o convite para ser revisor desta tese e por toda paciência e carinho em ouvir cuidadosamente todas as minhas apresentações de resultados, me dando incentivo e idéias novas para o projeto.

A todos os integrantes do Laboratório de “Laboratório de Hemostase e Venenos” e do “Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas e Peptídeos”, que fazem do nosso laboratório um local receptivo, descontraído e agradável de trabalhar e em especial à Luciana Wermelinger, Mariane Assafim, Tatiana Lobo e Luize Lima por serem minhas grandes amigas e companheiras de pós-graduação.

A Doutora Carmen Nogueira (Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ) bem como seus subordinados que sempre estiveram à disposição para fornecer as incontáveis amostras de plasma humano utilizadas na purificação de trombina descrita nesta tese.

Especialmente a Tereza, Patrícia e a toda equipe da Secretaria da Pós-Graduação em Química Biológica por toda a atenção e pelo ótimo tratamento dado a mim em todas as ocasiões.

A equipe do LABFAR, do Departamento de Análises clínicas/ UFRJ (Luzinete, Neide, Ana Lúcia e Nilma), pela enorme boa vontade em me ajudar na coleta de sangue usado nos experimentos realizados nesta dissertação e em especial à Luzinete, que me ensinou a coletar sangue.

A Professora Maria Aparecida Juliano, da UNIFESP, pela importante colaboração através da síntese dos peptídeos (TRAPs), usados em experimentos mostrados nesta dissertação.

Aos Professores Eliézer Barreiro, Lidia Lima, Carlos Mansur e Ana Luísa Palhares do LASSBio pela colaboração e pelas importantes discussões sobre este projeto.

Aos amigos e colaboradores Luíze Lima, Saulo Vieira e Eduardo Coriolano pela amizade e ajuda nos experimentos de Citometria de fluxo e no Fluorímetro.

Agradeço igualmente, a todos os amigos do Instituto de Bioquímica Médica pelo companheirismo e “empréstimos” eternos, pois sem estas duas coisas o trabalho de qualquer um seria impossível de se realizar.

## Resumo

Neste trabalho nós testamos quatro compostos de uma série de derivados acilhidrazônicos (L-693, L-694, L-743 e L-752) que apresentam diferentes características nos seus grupos não-farmacofóricos. Cada compostos (200  $\mu$ M) foi testado no ensaio de agregação plaquetária, em plaquetas de rato, induzido por trombina (10 nM), com mínimo de 36 % e máximo de 82 % de inibição obtido com L-743 e L-752, respectivamente. Na tentativa de avaliar se estes compostos estariam interferindo diretamente com a trombina ou com seus receptores, nós usamos o agonista do receptor PAR-4: TRAP-4A. A presença de L-693, L-694, L-743 e L-752 (200  $\mu$ M), levou a 76.5 %, 58.2 %, 42.7 % e 53.1 % de inibição respectivamente. Nenhum composto inibiu efetivamente a agregação induzida por ADP (5  $\mu$ M), confirmando sua grande seletividade pela trombina. Em plaquetas humanas, na intenção de avaliar efeitos mais próximos da condição fisiológica, os compostos (195  $\mu$ M) L-693, L-694, L-743, e L-752, respectivamente inibiram 57 %, 53 %, 37 % e 84 % a agregação plaquetária induzida por trombina (10 nM) e L-693 mostrou uma grande inibição contra a indução por TRAP-4A (85 %), enquanto L-752 mostrou para indução por TRAP-1 (73 %). L-743 foi inefetivo para ambos os agonistas. Os compostos L-743 e L-752 não mostraram atividade contra a agregação induzida por colágeno ou ADP, enquanto L-694 inibiu ambos. Nós observamos que L-694 e L-752 (200  $\mu$ M) foram capazes de induzir pequenas alterações no tempo de recalcificação, 30 % e 23 %, respectivamente, em plasma humano. Somente L-693 mostrou 100% de inibição na hidrólise de S-2238, no entanto em altas concentrações (400  $\mu$ M). Estes compostos foram testados *in vivo*, em camundongos, usando o modelo de tromboembolia pulmonar induzido por injeção I.V. de colágeno e norepinefrina (ambos 500  $\mu$ g/mL) ou trombina (2000 UI/kg). Todos os compostos, administrados oralmente, mostraram ação antitrombótica efetiva, independente do estímulo trombótico. Nós também testamos um modelo de trombose que combina estase e hipercoagulabilidade em ratos. A administração oral de L-743 e L-752 (100  $\mu$ mol/kg) diminuiu efetivamente o peso do trombo em 73% e 37%, respectivamente. L-752 (100  $\mu$ mol/kg) foi capaz de diminuir o peso do trombo em 87.5 % quando o efeito foi avaliado através da indução da trombose 24 h depois da administração oral. Também inibiu totalmente a oclusão vascular no modelo de trombose arterial (6 e 15 h). Nossos resultados indicam que L-743 e L-752 potenciais candidatos para o tratamento de trombose por via oral.

## **Abstract**

In this work we tested four compounds of an acylhydrazone serie (L-693, L-694, L-743 and L-752) that present different characteristics on their non-pharmacophoric groups. Each compound (200  $\mu$ M) was tested against rat platelet aggregation induced by thrombin (10 nM), a minimum of 36% and a maximum of 82% of inhibition was obtained with L-743 and L-752, respectively. In the attempt to evaluate whether these compounds would be interfering directly to thrombin or its receptor, we used the receptor agonist for PAR-4: TRAP-4A. The presence of L-693, L-694, L-743 and L-752 (200  $\mu$ M), lead to 76.5 %, 58.2 %, 42.7 % and 53.1 % of inhibition, respectively. No compound effectively inhibited the platelet aggregation induced by ADP (5  $\mu$ M), confirming a greater selectivity for thrombin. In human platelet in order to evaluate their effects in a nearest system in the physiologic condition, compounds (195  $\mu$ M) L-693, L-694, L-743, and L-752, respectively inhibited by 57 %, 53 %, 37 % and 84 % the platelet aggregation induced by thrombin (10 nM) and L-693 showed a higher inhibition toward TRAP-4A induction (85 %), while L-752 for TRAP-1 induction (73 %). L-743 was ineffective for both PAR agonists. Compounds L-743 and L-752 showed no activity against collagen or ADP, while L-694 inhibited both. We observed that the compounds L-694 (200  $\mu$ M) and L-752 (200  $\mu$ M) were capable of inducing slight alterations in recalcification time by 30 % and 23 %, respectively, in human plasma. Only L-693 compound showed 100% inhibition of hydrolysis of S-2238 however at high concentration 400  $\mu$ M. These compounds were further tested *in vivo*, in mice, using a pulmonary thromboembolism model induced by I.V. injection of collagen and norepinephrine (both 500  $\mu$ g/mL) or thrombin (2000 UI/kg). All compounds, orally administrated, showed effective antithrombotic action, independently of the thrombotic stimulus. We also tested a thrombosis model that combines stasis and hypercoagulability in rats.. Oral administration of L-743 and L-752 (100  $\mu$ mol/kg) effectively decreased thrombus weight by 73% and 37%, respectively. L-752 (100  $\mu$ mol/kg) as able to decrease thrombus weight by of 87.5 % when tesded 24 h after oral administration. It also inhibited total vascular occlusion in the model of arterial thrombosis (6 and 15 h after oral administration). So far our results indicate that compounds L-743 and L-752 are potential candidates the treatment of thrombosis by oral administration.

# Sumário

<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	XV
<b>Índice de figuras</b>	XVIII
<b>Índice de tabelas</b>	XXII
<b>1. Introdução</b>	
1.1. O Sistema hemostático	01
1.2. Hemostasia primária	02
1.3. Plaquetas	02
1.3.1. Receptores plaquetários	05
1.3.1.1. ADP	06
1.3.1.2. Colágeno	09
1.3.1.3. Trombina	12
1.3.2. Sinalização plaquetária mediada por cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ )	19
1.3.3. Superfície plaquetária	22
1.3.4. Mecanismo de ativação plaquetária	24
1.4. Coagulação sanguínea	26
1.5. Trombina	31
1.6. Controle da hemostasia	35
1.7. Trombose	40
1.8. Derivados Acilhidrazônicos	44
<b>2. Objetivos</b>	
1.8. Objetivos gerais	46
1.8. Objetivos específicos	47
<b>3. Materiais e Métodos</b>	
3.1. Animais	48
3.2. Metodologia	
3.2.1. Isolamento da $\alpha$ -trombina humana	48

3.2.2. Ensaio de fibrinocoagulação	49
3.2.3. Atividade amidolítica da trombina	50
3.3.4. Tempo de recalcificação	50
3.3.5. Agregação plaquetária usando (Plaquetas de coelho)	51
3.3.6. Agregação plaquetária usando (Plaquetas humanas)	52
3.3.7. Agregação plaquetária usando (Plaquetas de rato)	53
3.3.8. Mensuração de cálcio citoplasmático	54
3.3.9. Citometria de fluxo	55
3.3.10. Ensaio de tromboembolia pulmonar induzida por colágeno e norepinefrina	56
3.3.11. Ensaio de tromboembolia pulmonar induzida por trombina	56
3.3.12. Trombose venosa induzida por estase e hipercoagulabilidade	57
3.3.13. Modelo de trombose arterial	59
3.3.14. Ensaio de aPTT e PT ex vivo	61
3.3.15. Modelo de hemorragia induzida	61
3.3. Análise estatística	
<b>4. Resultados</b>	
4.1. Agregação plaquetária em plaquetas de coelho	63
4.2. Agregação plaquetária em plaquetas de rato	65
4.2.1. Indução por trombina	65
4.2.2. Indução por ADP	65
4.2.3. Indução por TRAP-4A	67
4.3. Atividade amidolítica da trombina	68
4.4. Ensaio de fibrinocoagulação	70
4.5. Tempo de recalcificação em plasma de rato	72
4.6. Tromboembolia pulmonar	73
4.6.1. Indução por colágeno e norepinefrina	73
4.6.2. Indução por trombina	76
4.7. Trombose venosa profunda	78

4.8. Tempo de hemorragia induzido	79
4.9. Avaliação do composto L-752 no modelo de trombose venosa profunda	80
4.10. Avaliação do composto L-752 no modelo de trombose Arterial	84
4.11. Avaliação do composto L-752 no modelo de hemorragia induzido	86
4.12. Avaliação do composto L-752 nos ensaios de aPTT e PT ex vivo	87
4.13. Agregação plaquetária em plaquetas humanas	89
4.13.1. Indução por trombina	89
4.13.2. Indução por colágeno e ADP	90
4.13.3. Indução por TRAP-1 e TRAP-4A	92
4.14. Tempo de recalcificação em plasma humano	97
4.15. Mensuração de cálcio citoplasmático	99
4.16. Interações com o receptor PAR-1	102
<b>5. Sumário de resultados</b>	<b>107</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>112</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>124</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>125</b>
<b>9. Anexo 1</b>	<b>143</b>
<b>10. Anexo 2</b>	<b>152</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AA – Ácido araquidônico  
ADP - Adenosina difosfato  
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico  
APC – Proteína C ativada  
ATP – Adenosina trifosfato  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio  
CLEC-2 – Receptor lectin-like tipo C2  
COX-1 – Ciclooxigenase 1  
COX-2 – Ciclooxigenase 2  
D.O. - Densidade ótica  
Da – Dáltons  
DAG – Diacilglicerol  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetrácetico  
EGF- Fator de crescimento epidermal  
EGTA – Ácido tetrácetico de etileno glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter) N,N,N',N'  
EMC – Matriz extracelular  
EPCR – Receptor de células endoteliais  
FRS – Exosítio I  
GP – Glicoproteína  
GTP – Guanidina trifosfato  
HBS – Exosítio II  
HCl – Ácido clorídrico  
I3P – Inositol trifosfato  
IP<sub>3</sub> – Inositoltrifosfato  
IP<sub>3</sub>R – Receptor de IP<sub>3</sub>  
KCl – Cloreto de potássio  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

Na Cl – Cloreto de sódio  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio  
NO – Óxido nítrico  
PAF – Fator ativador de plaquetas  
PAR – Receptor ativado por protease  
PBS – Tampão de fosfato salina  
PC – Proteína C  
PEG – Polietilenoglicol  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGG<sub>2</sub> – Prostaglandina G<sub>2</sub>  
PGH<sub>2</sub> - Prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> – Prostaciclina  
PI3-K – Fosfatidilinositol 3 quinase  
PIP<sub>2</sub> – Fosfatidil-inositol bifosfato  
PKC – Proteína quinase C  
PL – Plaquetas  
PLC – Fosfolipase C  
PMCAS - Ca<sub>+2</sub> ATPase  
PPP – Plasma pobre em plaquetas  
PRO – Protrombina  
PRP – Plasma rico em plaquetas  
SERCAS – Ca<sub>+2</sub> ATPase de retícula sarcoplasmático/endoplasmático  
T – Trombina  
TF – Fator tecidual  
TFPI – Inibidor da via do fator tecidual  
TM – Trombomodulina  
t-PA - Enzimas ativadoras de plasminogênio tipo tecidual  
TR - Tempo de recalcificação  
TRAP-1 – Agonista de PAR-1  
TRAP-4A – Agonista de PAR-4

TXA<sub>2</sub> – Tromboxana A<sub>2</sub>

u-PA - Enzimas ativadoras de plasminogênio tipo uroquinase

VTE – Tromboembolia venosa

vWF – Fator de von Willebrand

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estágios da formação do “tampão” plaquetário.	04
<b>Figura 2:</b> Vias de sinalização dos receptores plaquetários de ADP.	08
<b>Figura 3:</b> Adesão de plaquetas ao colágeno.	11
<b>Figura 4:</b> Modulação positiva da GPIb $\alpha$ na clivagem do receptor PAR-1.	14
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de clivagem do PAR.	15
<b>Figura 6:</b> Mobilização de cálcio intracelular.	21
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática das reações que levam a expressão da superfície pró-coagulante em plaquetas.	23
<b>Figura 8:</b> Complexos enzimáticos associados a superfícies celulares.	30
<b>Figura 9:</b> Cascata de coagulação.	32
<b>Figura 10:</b> Modelo estrutural da $\alpha$ -trombina.	35
<b>Figura 11:</b> Esquema estrutura do complexo $\alpha$ -trombina- trombomodulina e a ativação da proteína C.	39
<b>Figura 12:</b> Via da proteína C ativada.	39

<b>Figura 13:</b> Estratégia de preparação dos derivados acilhidrazônicos.	45
<b>Figura 14:</b> Procedimento do modelo de trombose venosa profunda induzida por estase e hipercoagulabilidade.	59
<b>Figura 15:</b> Modelo de trombose arterial .	60
<b>Figura 16:</b> Modelo de hemorragia induzido.	62
<b>Figura 17:</b> Agregação plaquetária induzida por trombina (10 nM) em plaquetas de rato.	66
<b>Figura 18:</b> Agregação plaquetária induzida por ADP (5 $\mu$ M) Em plaquetas de rato.	67
<b>Figura 19:</b> Agregação plaquetária induzida por TRAP-4A (AYPGKF) (0,25 mM) em plaquetas de rato.	69
<b>Figura 20:</b> Atividade catalítica da trombina medida através da clivagem de S-2238.	71
<b>Figura 21:</b> Ensaio de fibrinocoagulação.	72
<b>Figura 22:</b> Tempo de recalcificação realizado com plasma de rato pobre em plaquetas (PPP).	73
<b>Figura 23:</b> Tromboembolia pulmonar induzida por colágeno e norepinefrina.	75

<b>Figura 24:</b> Tromboembolia pulmonar induzida por trombina.	77
<b>Figura 25:</b> Efeito dos derivados acilhidrazônicos sobre a trombose venosa profunda.	79
<b>Figura 26:</b> Determinação do risco hemorrágico.	81
<b>Figura 27:</b> Efeito LASSBio 752 sobre a trombose venosa profunda.	82
<b>Figura 28:</b> Curso temporal do efeito do LASSBio 752 sobre a trombose venosa profunda.	83
<b>Figura 29:</b> Efeito tempo dependente do LASSBio 752 sobre a trombose arterial.	85
<b>Figura 30:</b> Medida do fluxo sanguíneo após administração do LASSBio 752 no modelo de trombose arterial.	86
<b>Figura 31:</b> Determinação do risco hemorrágico do composto LASSBio 752.	88
<b>Figura 32:</b> Agregação plaquetária induzida por trombina (10 nM) em plaquetas humanas.	91
<b>Figura 33:</b> Agregação plaquetária induzida por colágeno (1,6 µg/mL) em plaquetas humanas.	93
<b>Figura 34:</b> Agregação plaquetária induzida por ADP (5 µM) em plaquetas humanas.	94

<b>Figura 35:</b> Agregação plaquetária induzida por TRAP-1 (SFLLRNP) (16,4 $\mu$ M) em plaquetas humanas.	96
<b>Figura 36:</b> Agregação plaquetária induzida por TRAP-4A (AYPGKF) (0,25 mM) em plaquetas humanas.	97
<b>Figura 37:</b> Resumo das agregações plaquetária em plaquetas humanas.	99
<b>Figura 38:</b> Tempo de recalcificação realizado com plasma humano pobre em plaquetas (PPP).	100
<b>Figura 39:</b> Avaliação da interferência sobre a ligação de PAR-1.	105
<b>Figura 40:</b> Interação com receptor PAR-1.	106

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Agonistas plaquetários fisiológicos.	06
<b>Tabela 2:</b> Fatores da coagulação e inibidores presentes no plasma.	29
<b>Tabela 3:</b> Agentes antitrombóticos.	43
<b>Tabela 4:</b> Agregação plaquetária em plaquetas de coelho.	64
<b>Tabela 5:</b> Valores de IC <sub>50</sub> calculados para agregação plaquetária (plaquetas de rato).	70
<b>Tabela 6:</b> aPTT e PT <i>ex vivo</i> do composto LASSBio 752.	89
<b>Tabela 7:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos nos ensaios de agregação plaquetária (humanas) induzida por trombina, colágeno e ADP.	95
<b>Tabela 8:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos nos ensaios de agregação plaquetária (humanas) induzida por trombina, TRAP-1 e TRAP-4A.	98
<b>Tabela 9:</b> Porcentagem de inibição do influxo de cálcio intracelular induzido por trombina.	102
<b>Tabela 10:</b> Porcentagem de inibição do influxo de cálcio intracelular induzido por TRAP-1.	103
<b>Tabela 11:</b> Porcentagem de inibição do influxo de cálcio intracelular induzido por TRAP-4A.	104

## 1.1. O Sistema Hemostático

O sistema vascular exerce um papel fundamental no transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e macromoléculas para os tecidos e no transporte de catabólicos para serem excretados ( $\text{CO}_2$ ). A manutenção da integridade do sistema vascular é absolutamente vital para o organismo humano, uma vez que a perda de uma quantidade significativa de sangue através de uma lesão vascular é incompatível com a vida. Desta forma, um mecanismo complexo denominado sistema hemostático reconhece o dano vascular e recruta uma combinação apropriada de componentes celulares e proteínas plasmáticas solúveis, produzindo um “tampão” insolúvel, que cessa a perda sangüínea (KALAFATIS e col., 1994; DAVIE e col., 1991; SOLUM, 1999; ROSENBERG, 2001). Os principais constituintes deste “tampão” incluem as plaquetas e um polímero insolúvel de fibrina, que é formada a partir de uma proteína plasmática solúvel denominada fibrinogênio. As células endoteliais vasculares, devido às suas propriedades antitrombóticas, desempenham papel importante na manutenção da hemostasia (ASAKURA, 2004). O sistema hemostático é relativamente quiescente se o dano vascular não está presente, entretanto, em caso de lesão vascular, ocorre rapidamente a deposição de plaquetas, que aderem a estruturas específicas presentes no subendotélio, particularmente fibras de colágeno (SOLUM, 1999), e de fibrina no local da lesão de acordo com a extensão da mesma (BOURIN e LINDAHL, 1993; ESMON, 2000; ROSENBERG, 2001).

## 1.2. Hemostasia Primária

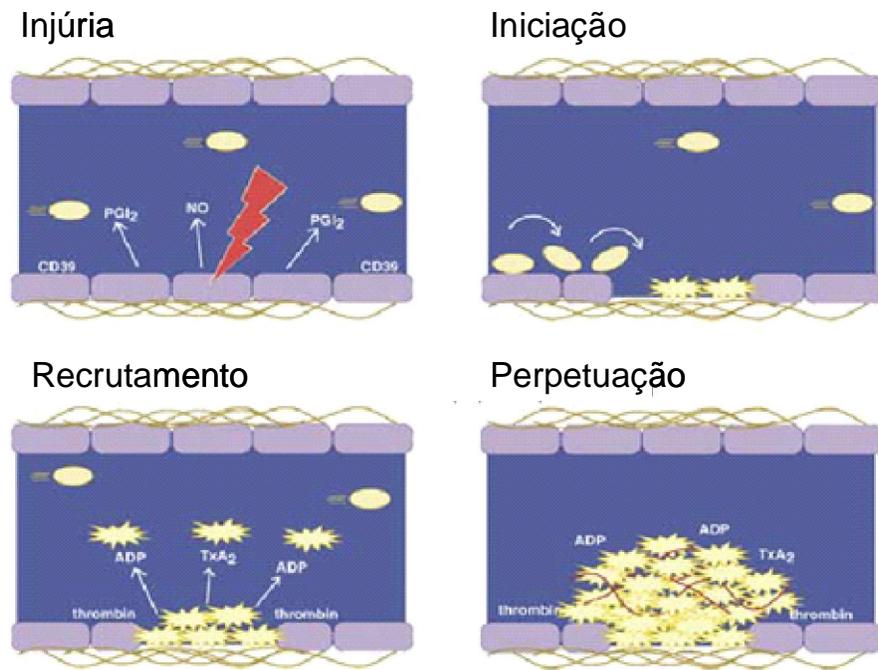
Quando a integridade da parede vascular é interrompida, ocorre a ativação do sistema hemostático. Este fenômeno envolve diversas interações entre componentes endoteliais e subendoteliais, plaquetas e outras células sanguíneas periféricas e proteínas pró-coagulantes circulantes. As plaquetas desempenham um papel essencial nestas interações, pois participam diretamente da primeira fase da hemostasia, contribuindo com seus receptores de membrana que facilitam e amplificam a atividade localizada dos fatores da coagulação sanguínea (KALAFATIS e col., 1994; HAWINGER e col., 1994; RUGGERI, 1997; JACKSON e col., 2009).

## 1.3 Plaquetas

As plaquetas são células anucleadas e de formato discóide, derivadas da fragmentação do citoplasma de uma célula precursora chamada de megacariócito, célula esta formada na medula óssea (ERUSALIMSKY e MARTIN, 1996; BLUTEAU e col., 2009). O sangue humano apresenta normalmente de 200 a 400 x 1000 plaquetas/ mm<sup>3</sup> (VARGA-SZABO e col., 2009; BLUTEAU e col., 2009).

Em condições normais, as plaquetas circulam no sangue em estado de repouso sob a forma discóide, sendo impedidas de interagir com a matriz subendotelial graças ao endotélio vascular que funciona como uma barreira anatômica que exerce ativamente funções antiadesivas e antiagregantes

(ASAKURA, 2004; BLUTEAU e col., 2009), entretanto, quando recrutadas devido a alterações dessas células endoteliais e a exposição de moléculas do subendotélio, principalmente colágeno e fator de von Willebrand, sofrem uma drástica mudança morfológica (PREVOST e col., 2003; NIESWANDT e WATSON, 2003; VARGA-SZABO e col., 2009). Quando expostas a agonistas como ADP, serotonina, trombina ou colágeno elas são ativadas mudando da forma discóide para a forma esférica com extensa emissão de pseudópodos, processo chamado de “shape change”, aderindo rapidamente ao local da lesão vascular (RUGGERI, 2007; JACKSON, 2008). A adesão ao subendotélio pode acontecer diretamente ou através de moléculas de adesão presentes nas membranas das plaquetas. Receptores na superfície das plaquetas aderidas são ativados e interagem com plaquetas através de ligantes específicos, melhorando assim, a aderência plaquetária. Substâncias presentes nas plaquetas aderidas são secretadas de organelas de armazenamento (grânulos densos e grânulos alfa), contribuindo ainda mais para a adesão e agregação plaquetária. Como resultado, o “tampão” plaquetário é formado na área danificada como uma primeira defesa no processo hemostático (SOLUM, 1999; JACKSON, 2008) (Figura 1).



**Figura 1: Estágios da formação do “tampão” plaquetário.**

Antes da injúria vascular, as plaquetas são impedidas de interagir entre si por fatores inibitórios que incluem a  $\text{PGI}_2$  e o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) produzidos pelo endotélio. O desenvolvimento do “tampão” plaquetário pode ser iniciado pela exposição de colágeno na parede do vaso ou por geração de trombina local (ou ambos). As plaquetas aderidas na matriz de colágeno e vWF, formam uma monocamada de células ativadas que atuam como uma superfície para o recrutamento subsequente de plaquetas por trombina,  $\text{ADP}$  e  $\text{TXA}_2$ .

Adaptado de *PREVOST, 2003*.

### 1.3.1 Receptores plaquetários

As plaquetas possuem receptores para macromoléculas adesivas, tais como o fator de von Willebrand (vWf), o fibrinogênio, a fibronectina e o colágeno, que são de grande importância para interação inicial de plaquetas circulantes com a parede vascular após a injúria (HAWIGER e col., 1985; ANDREWS e BERNDT, 2004; NIESWANDT e col., 2009) sendo estas moléculas também importantes para o processo de agregação plaquetária, principalmente em condições de alta taxa de cisalhamento, e na estabilização do trombo à ser formado (JACKSON, 2008). Outros receptores tornam-se funcionais quando as plaquetas são ativadas. Desta forma, para formar um agregado compacto, as plaquetas mobilizam alguns receptores de membrana, particularmente a glicoproteína IIb/IIIa (GP  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), em resposta aos sinalizadores extracelulares que podem ser solúveis como ADP e trombina, ou como o colágeno que está presente no espaço subendotelial. Estes agonistas extracelulares interagem com receptores específicos das plaquetas, gerando um mecanismo de sinalização necessário à “ativação” ou “exposição” dos receptores de membrana (HAWIGER e col., 1994).

A ativação plaquetária pode também ser mediada por outros agonistas, que atuam em receptores plaquetários específicos (Tabela 1), que são formados no sítio da injúria ou secretados pelas próprias plaquetas, amplificando a resposta celular (BRASS, 1995).

Descreveremos então algumas características da interação entre os principais indutores de agregação plaquetária e seus receptores.

**Tabela 1: Agonistas plaquetários fisiológicos.**

<b>Agonista</b>	<b>Receptor</b>	<b>Tipo de receptor</b>	<b>Referência</b>
ADP	P2Y <sub>1</sub> P2Y <sub>12</sub>	Acoplados à Proteína G	Andrews e Berndt, 2004
Colágeno	GP IV GP VI	Tirosina fosfatase	Watson, 1999
Epinefrina	Recetor de epinefrina	Acoplado à Proteína G	Regan e col., 1986
PAF	Receptor de PAF	Acoplado à Proteína G	Chao e Olson, 1993
$\alpha$ -trombina	GP Ib Par 1 Par 4	Acoplados à Proteína G	Ofosu e Nyarko, 2000
Tromboxana A <sub>2</sub>	Receptor de tromboxana A <sub>2</sub>	Acoplado à Proteína G	Saussy e col., 1986

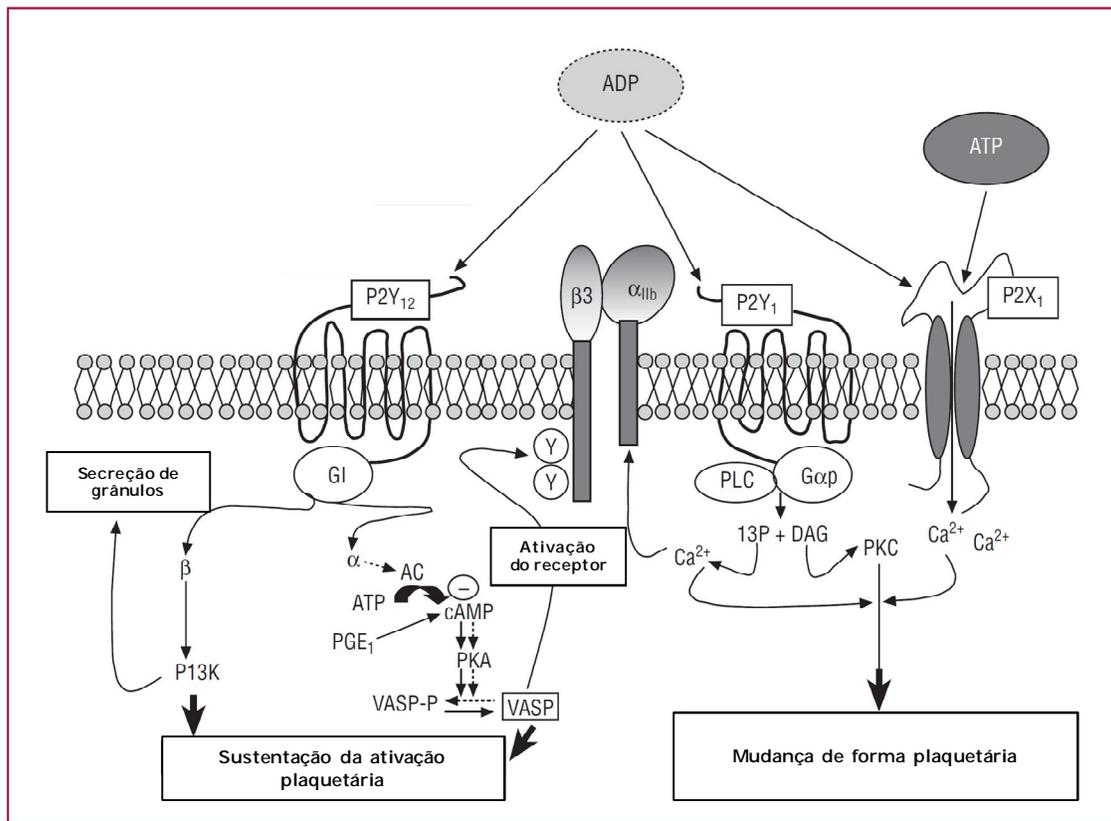
## ● ADP

Os receptores para ADP presentes nas plaquetas são receptores purinérgicos pertencentes à classe P2, enquanto os pertencentes à classe P1 reconhecem a adenosina e estão presentes em células epiteliais, renais e do sistema nervoso entre outras (NEEDHAM e col., 1987; BUCHEIMER e LINDEN, 2003, CATTANEO, 2009).

O ADP ativa as plaquetas via dois receptores: P2Y1 e P2Y12, receptores estes que são acoplados à proteína G. O receptor P2Y1 está acoplado à proteína Gq, ativa fosfolipase C, mobilizando  $Ca^{+2}$  dos estoques intracelulares plaquetários e levando a ativação da proteína quinase C, regulando assim os eventos de sinalização  $Ca^{+2}$ -dependentes, que iniciam rapidamente o “shape change” e reforçam a agregação plaquetária dependente da GP IIb/IIIa por mecanismos que envolvem mudanças conformacionais tanto na região extracelular, quanto na região citoplasmática, reestruturação tal que favorece a ligação desta glicoproteína ao fibrinogênio (PHILLIPS e col., 1991; ANDREWS e BERNDT, 2004; MAZZUCATO e col., 2004; JACKSON, 2008; CATTANEO, 2009). O receptor P2Y12 é um “Gai-like” e ativa a GP IIb/IIIa por um mecanismo envolvendo a inibição da produção de AMPc pela adenilato ciclase, potencializando a agregação plaquetária induzida por ADP (ANDREWS e BERNDT, 2004; MAZZUCATO e col., 2004; CATTANEO, 2009). Este receptor é alvo de drogas antitrombóticas como o clopidogrel (BHATT e TOPOL, 2003). Sendo assim, atualmente supõe-se que a relação entre esses dois receptores plaquetários para ADP é que P2Y1 inicia a agregação e P2Y12 a reforça (MAZZUCATO e col., 2004; BADIMON e VILAHUR, 2008; CATTANEO, 2009) (Figura 2).

Plaquetas ativadas por outros agonistas (incluindo colágeno, vWf, ou trombina) secretam ADP que estão presentes nos grânulos densos, e este ADP, por sua vez, atua em seus receptores presentes na superfície das plaquetas estabilizando a agregação plaquetária (KAUFFENSTEIN e col., 2004, JACKSON, 2008).

Estudos recentes usando camundongos deficientes em receptores P2Y1 e/ou P2Y12 têm confirmado o papel crítico desses receptores na formação de trombos, mostrando que a incidência de trombose arterial nesses animais é significativamente menor quando comparada a animais normais (MAZZUCATO e col., 2004, BADIMON e VILAHUR, 2008).



**Figura 2:** Vias de sinalização dos receptores plaquetários de ADP.

Adenosina difosfato (ADP); Adenosina trifosfato (ATP); Diacilglicerol (DAG); Inositol trifosfato (I3P); Prostaglandina E1 (PGE1); Proteína Quinase C (PKC) e Fosfolipase C (PLC).

Adaptado de *BADIMON e VILAHUR, 2008.*

## ● Colágeno

As interações entre o colágeno, um dos constituintes da matriz extracelular (EMC) mais reativos e as plaquetas são de grande importância no processo de cisalhamento que ocorre entre as plaquetas e o endotélio tanto em fluxos sanguíneos altos como médios, encontrados, por exemplo, em doenças vasculares (OZAKI e col., 2009).

A adesão e agregação plaquetária mediada por colágeno é um processo integrado que envolve vários agonistas plaquetários que agem através de uma variedade de receptores de superfície, incluindo integrinas, receptores semelhantes a imunoglobulinas e receptores acoplados à proteína G. O colágeno se liga direta ou indiretamente a duas integrinas plaquetárias, chamadas de GP  $\alpha_2\beta_1$  e GP IIb/IIIa (via vWf), respectivamente. Contudo, para isto acontecer pelo menos uma dessas integrinas tem que sofrer uma conversão que leve a uma conformação de alta afinidade em resposta a sinais gerados pela GP VI e reforçados pela secreção de mediadores como ADP e tromboxana  $A_2$ . (NIESWANDT e WATSON, 2003).

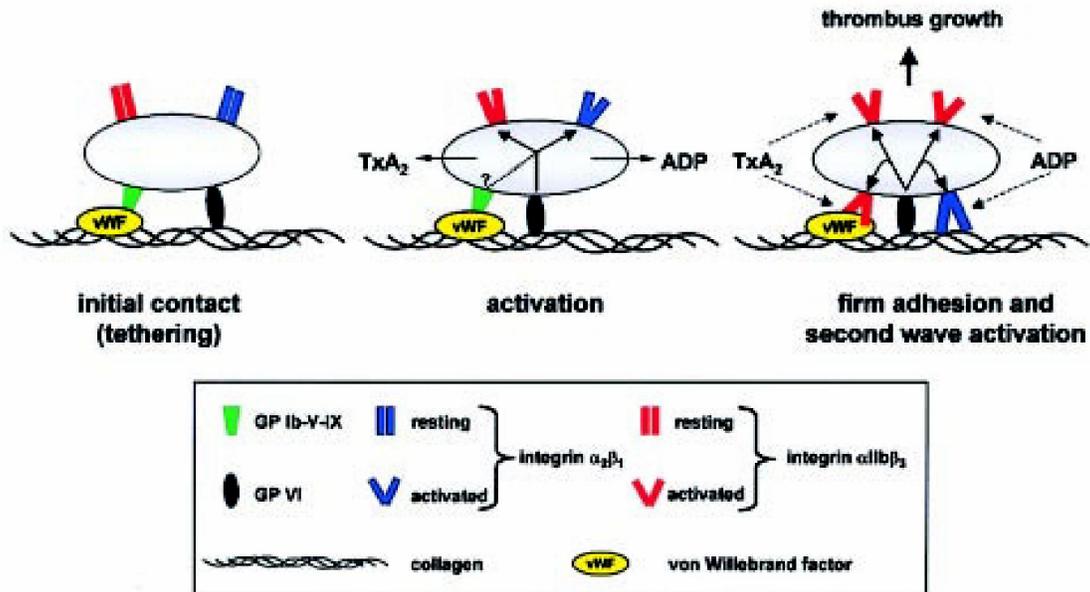
TANDON e col., (1989) descreveram uma glicoproteína (GPVI), de 88 kDa, que quando purificada, é capaz de inibir a agregação plaquetária, secreção e “shape change” induzidos pelo colágeno. Então foi proposto que a GPVI era um receptor plaquetário de colágeno, mas não era evidente que esta glicoproteína tivesse um papel importante na ativação plaquetária, uma vez que, este receptor está ausente em aproximadamente 3 a 5 % da população japonesa, e sem que estes indivíduos apresentem problemas hemostáticos. Outros trabalhos

mostraram que a transdução de sinal em resposta ao colágeno era normal em plaquetas deficientes em GPIV, dados estes que corroboram com o que se acreditava sobre este receptor. Além disso, outro trabalho mostrou que anticorpos gerados contra a GPIV são inibidores fracos da adesão plaquetária ao colágeno, sugerindo que este receptor tenha apenas um papel menor na interação entre colágeno e plaquetas (Revisado por WATSON, 1999).

A glicoproteína VI (GP VI) é um receptor de colágeno da superfamília das imunoglobulinas, que possui dois domínios extracelulares similares a imunoglobulina, um domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática de aproximadamente 51 aminoácidos (ANDREWS e BERNDT, 2004; OZAKI e col., 2009). Esta glicoproteína forma um complexo com a cadeia- $\gamma$  do receptor Fc (Fc- $\gamma$ R), complexo este presente na membrana das plaquetas. Estudos mostraram que o Fc- $\gamma$ R apresenta um domínio ITAM, que é fosforilado em tirosina e que serve de ponto de ancoragem para a ligação de tirosina quinases via domínio SH2 (domínio que reconhece resíduos fosforilados em tirosina) presente em quinases da família Src, por exemplo, na tirosina quinase Syk. A importância da fosforilação da cadeia- $\gamma$  FcR e Syk na ativação plaquetária induzida por colágeno foi mostrada pela perda da ativação plaquetária em plaquetas “knock-out” que não apresentavam nenhuma, ou uma das duas proteínas sinalizadoras (Fc- $\gamma$ R e Syk) (WATSON e GIBBINS, 1998; NIESWANDT e WATSON, 2003; ANDREWS e BERNDT, 2004).

Atualmente é reconhecido que a adesão firme ao colágeno requer a prévia ativação de integrinas através de sinalização gerada pela GPVI, e que esta

adesão é reforçada pela liberação de mediadores como ADP e TXA<sub>2</sub> (NIESWANDT e WATSON, 2003; OZAKI e col., 2009) (Figura 3).



**Figura 3: Adesão de plaquetas ao colágeno.**

O contato inicial entre o colágeno e a matriz extracelular (EMC) é mediado predominantemente por GPIb $\alpha$ -vWf e GPVI-colágeno. No segundo passo, as interações GPVI-colágeno iniciam a ativação celular seguida pela mudança conformacional das integrinas para um estado de alta afinidade e a secreção de agonistas de segunda onda, sendo ADP e TXA<sub>2</sub> os mais importantes. Finalmente, a adesão firme entre plaquetas e colágeno através da ativação de GP  $\alpha_2\beta_1$  (diretamente) e GP  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (indiretamente via vWf) resulta na sustentação da sinalização de GPVI, melhorando a secreção, e a atividade pró-coagulante. Adaptado de NIESWANDT e WATSON, 2003.

## ● Trombina

Três receptores plaquetários de membrana, chamados de glicoproteína (GPIb), receptor ativado por protease-1 (PAR-1) e receptor ativado por protease-4 (PAR-4), têm sido descritos atualmente como receptores de  $\alpha$ -trombina em plaquetas humanas (OFOSU e NYARKO, 2000; MONROE, 2002).

Já é bem conhecido que a interação entre a trombina e o complexo GPIb-IX-V na superfície das plaquetas facilita a ativação plaquetária. Mais especificamente, tem sido mostrado que a interação entre trombina e GPIb $\alpha$ , que é uma glicoproteína integral de membrana plaquetária, é necessária para uma ativação plaquetária ideal (DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; ADAM e col., 2003; SAKURAI e col., 2004).

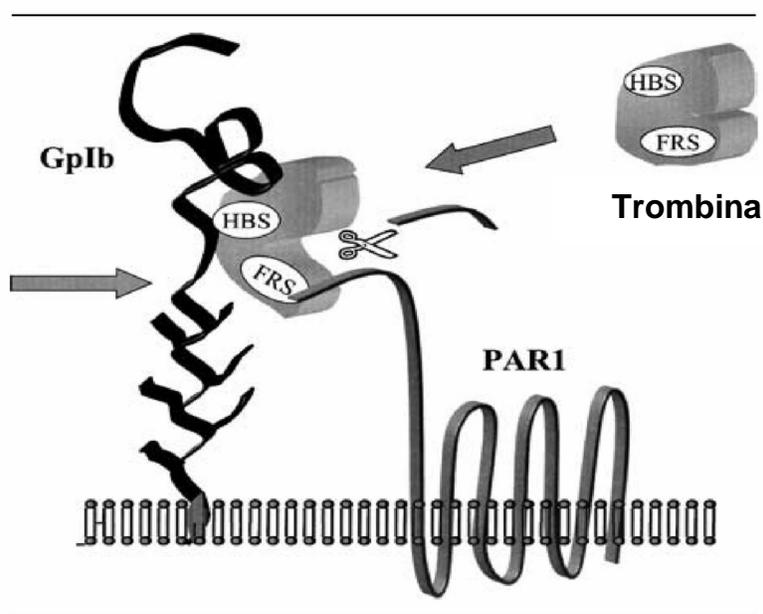
O complexo GPIb-IX-V é composto por quatro subunidades transmembrana: GPIb $\alpha$  ligada covalentemente à GPIb $\beta$ , GPIX e GPV, na proporção de 2:2:2:1. Uma função importante da GPIb é a ligação ao vWf e a iniciação da adesão plaquetária ao sítio de injúria vascular. Adicionalmente, a GPIb tem um sítio de ligação de alta afinidade para a trombina, estando este sítio presente na porção N-terminal da subunidade  $\alpha$  da GPIb (DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; ADAM e col., 2003).

A GPIb contribui para a ativação e agregação plaquetária induzida por baixas concentrações de trombina e iniciam uma via de sinalização que envolve a ativação de quinases da família Src e de fosfatidilinositol-3-quinase, por aumento da ativação de tirosinas-quinase, secreção de ADP e ativação da GP IIb/IIIa (ADAM e col., 2003).

Estudos recentes mostraram que GPIIb/IIIa pode modular positivamente a clivagem do receptor PAR-1 pela trombina e conseqüentemente a ativação de plaquetas humanas (Figura 4). Medindo diretamente a hidrólise de PAR-1 em plaquetas intactas observou-se que a inibição da ligação da trombina à GPIIb/IIIa inibiu também a clivagem de PAR-1 em plaquetas humanas. O mecanismo pelo qual a interação entre GPIIb/IIIa e trombina aumenta a hidrólise de PAR-1 ainda não é conhecido (DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003).

Os receptores ativados por proteases (PARs), por sua vez, apresentam sete domínios hidrofóbicos transmembrana, um domínio C-terminal intracelular e um domínio N-terminal extracelular, que são acoplados à proteína G (COUGHLIN, 1999; FARUQI e col., 2000; NANTERMET e col., 2002; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004; VAN GEET e col., 2009). A família dos receptores PAR é composta por quatro receptores: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4 são ativados por trombina, enquanto PAR-2 é ativado por tripsina (GUDMUNDSDÓTTIR e col., 2008). Eles estão distribuídos em diversos sistemas como sistema nervoso, gastro-intestinal, respiratório, circulatório e cardiovascular entre outros. A ativação desses receptores inicia uma cascata de eventos de sinalização em vários tipos celulares com diversas conseqüências variando de hemostase a transmissão de dor. No sistema circulatório e cardiovascular os receptores tipo PAR são expressos em células circulantes, bem como em células endoteliais e células da musculatura vascular. As plaquetas expressam vários receptores para trombina que variam de acordo com as espécies, sendo que em plaquetas humanas estão presente os receptores PAR-1

e PAR-4 (SHAPIRO e col., 2000; OFOSU, 2003; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004; OFUSO, 2008; GUDMUNSDÓTTIR e col., 2008).

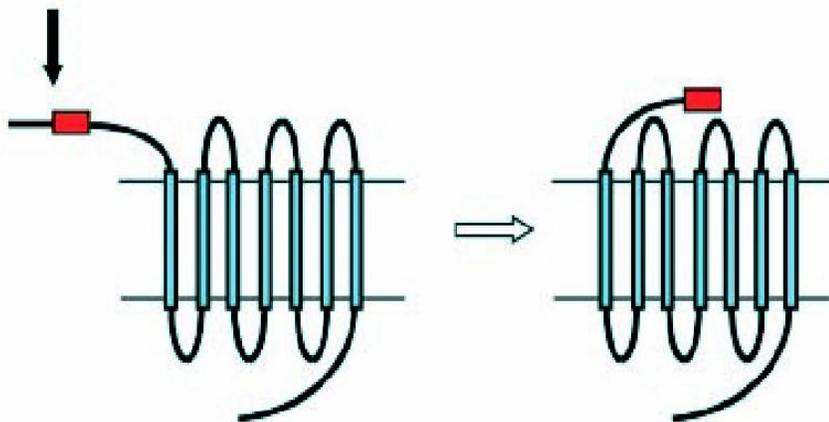


**Figura 4: Modulação positiva da GPIb $\alpha$  na clivagem do receptor PAR-1.**

Desenho mostrando o envolvimento do FRS (exosítio I) e HBS (exosítio II) na interação da trombina entre ambos: GPIb e PAR-1, na membrana da plaqueta. Pela ligação à GPIb, através do exosítio II, a hidrólise de PAR-1, envolvendo o exosítio I e o sítio catalítico é facilitada. As setas indicam somente um processo cinético, pelo qual a interação da trombina com a GPIb precede a com PAR-1. O mecanismo responsável pelo efeito positivo da interação entre trombina e GPIb na hidrólise de PAR-1 ainda não é conhecido.

Adaptado de DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003.

O mecanismo geral pelo qual proteases clivam e ativam PARs acontece através da clivagem em sítios específicos no domínio N-terminal destes receptores. Esta clivagem expõe um novo domínio N-terminal que serve como um domínio ligante verdadeiro, que interage com regiões conservadas no segundo “loop” extracelular do receptor clivado (Figura 5), resultando na iniciação e transdução de sinal (OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004).



**Figura 5: Mecanismo de clivagem do PAR.**

Mecanismo de clivagem e interação do novo domínio N-terminal com o segundo “loop” extracelular dos receptores do tipo PARs.

Adaptado de OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004.

A ativação de PAR-1 se inicia através da clivagem do receptor, pela trombina, no exodomínio N-terminal, entre a ligação peptídica R41/S42, liberando um peptídeo de 41 aminoácidos. Esta clivagem de PAR-1 forma o verdadeiro domínio ligante com a seqüência SFLLRN (OFOSU e NYARKO, 2000; OFOSU,

2003; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). Peptídeos sintéticos que mimetizam este novo domínio N-terminal do PAR-1 (SFLLRN) são capazes de produzir os mesmos efeitos celulares causados pela  $\alpha$ -trombina (NANTERMET e col., 2001; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004, OFUSO e col., 2008).

A alta afinidade e eficiência catalítica da  $\alpha$ -trombina sobre o PAR-1 é atribuída a uma região acídica (Y52-Y69) do receptor capaz de interagir com o exosítio I de ligação de ânions, da enzima. Pequenas concentrações de trombina ( $\geq 10$  nM de trombina) são capazes de ativar este receptor (OFUSO e col., 2008, 2009). Adicionalmente, a interação de peptídeos baseados nesta sequência acídica com o exosítio I da  $\alpha$ -trombina altera a conformação do sítio ativo da enzima (LIU e col., 1991; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003, MAO e col., 2008).

A transdução de sinal de PAR-1 começa com o acoplamento do receptor à proteínas Gs heterodiméricas na membrana plasmática das plaquetas. PAR-1 interage com várias  $\alpha$ -subunidades, em particular Gq 11 $\alpha$ , G12/13 $\alpha$  e Gi $\alpha$  (FARUQI e col., 2000; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). A subunidade Gq11 $\alpha$  ativa a fosfolipase C- $\beta$ 1, levando à geração de IP3, e diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC), que pode ser requerido para ativação de fosfolipase A2 (OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). A trombina estimula a incorporação de um análogo de GTP na G12/13 $\alpha$ , o efeito deste estímulo resulta na mudança de forma discóide da plaqueta ("shape change"), o que se acredita ser um pré-requisito para uma ativação completa (OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004, MAO e col., 2008). O acoplamento de PAR-1 a proteínas Gi $\alpha$ , inibe a adenilato ciclase, que suprime a formação de AMPc favorecendo o processo de

agregação plaquetária, uma vez que o aumento de AMPc leva a eventos que incluem: inibição da ligação das plaquetas à seus agonistas, inibição da formação de IP<sub>3</sub>, redução na magnitude e na duração das concentrações de íons Ca<sup>+2</sup> no citosol e inibição da expressão do receptor de fibrinogênio necessário à agregação plaquetária (FARUQI e col., 2000; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004).

A ativação de PAR-4 se inicia através da clivagem do receptor pela trombina no exodomínio N-terminal, entre a ligação peptídica R47/G48, liberando um peptídeo de 47 aminoácidos. Esta clivagem de PAR-4 forma o domínio ligante com a seqüência GYPGQV, que se liga ao segundo “loop” extracelular do receptor (OFOSU e NYARKO, 2000; FARUQI e col., 2000; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). Peptídeos sintéticos que mimetizam este novo domínio N-terminal do PAR-4 (GYPGQV) também são capazes de produzir os mesmos efeitos celulares causados pela  $\alpha$ -trombina (FARUQI e col., 2000; NANTERMET e col., 2001; MARYANOFF e col., 2003; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). Inversamente ao que acontece com o receptor PAR-1, a afinidade da trombina pelo receptor PAR-4 é bem reduzida, uma consequência provável da ausência de uma região acídica no receptor PAR-4. Esta hipótese é reforçada quando comparamos as concentrações necessárias de  $\alpha$ -trombina para se ativar plaquetas através desses receptores separadamente, que são de 0.5 nmol/L para PAR-1 e 30 nmol/L para PAR-4 (OFOSU, 2000; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003, MAO e col., 2008).

Os receptores do tipo PAR são ativados por proteases de forma irreversível. Assim como os receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, PAR-1 é rapidamente fosforilado e desacoplado da sinalização após a ativação pela trombina. Esta

fosforilação impede uma interação adicional com proteínas G. Dentro de um compartimento endossomal, a maioria dos receptores PAR-1, dissociados dos ligantes, são defosforilados e degradados. No entanto, PAR-4 não é rapidamente fosforilado depois da ativação pela trombina, possivelmente devido à falta dos sítios de fosforilação no domínio C-terminal, em consequência disso, PAR-4 é dessensibilizado mais lentamente. Esta baixa cinética de dessensibilização permite a PAR-4 uma sinalização mais prolongada em plaquetas humanas (COUGHLIN, 1999; SHAPIRO e col., 2000; OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). Portanto, PAR-1 e PAR-4 diferem na velocidade em que são removidos da membrana das plaquetas após a sua ativação. Experimentos medindo o influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) em plaquetas humanas mostraram que PAR-1 inicia um rápido aumento do  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático seguido por um rápido decaimento, enquanto PAR-4 inicia um aumento mais gradual e prolongado do  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. Desta forma a sinalização de  $\text{Ca}^{+2}$  iniciada por trombina em plaquetas humanas seria uma composição da sinalização de PAR-1 e PAR-4, com um rápido aumento provavelmente sendo mediado por PAR-1 seguido de uma elevação mais lenta mediada por PAR-4 (SHAPIRO e col., 2000; TANIMURA e col., 2003). A co-expressão destes receptores pode, então, servir como uma forma de modular a ativação das vias de sinalização intracelular pela trombina.

## 1.3.2 Sinalização plaquetária mediada por cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ )

A  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular é um fator chave e um segundo mensageiro essencial a todos os tipos celulares, regulando um vasto leque de processos celulares fundamentais e controlando ações em curto prazo, como secreção e agregação e também em longo prazo como crescimento celular. (JARDÍN e col., 2008; VARGA-SZABO e col., 2009; BERGMEIER e STEFANINI, 2009).

Considerando que a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  dos estoques intracelulares é transitória, a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  induz uma maior sustentabilidade e plena ativação de certos processos celulares. Após a estimulação,  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  é reduzida principalmente pelo seqüestro de  $\text{Ca}^{+2}$  para os estoques e extrusão em toda a membrana plasmática, através da ação dos diferentes  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPases e trocadores. Estes mecanismos são também responsáveis para manter uma baixa  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  em células não ativadas (ROSADO e SAGE, 2002; JARDÍN e col., 2008).

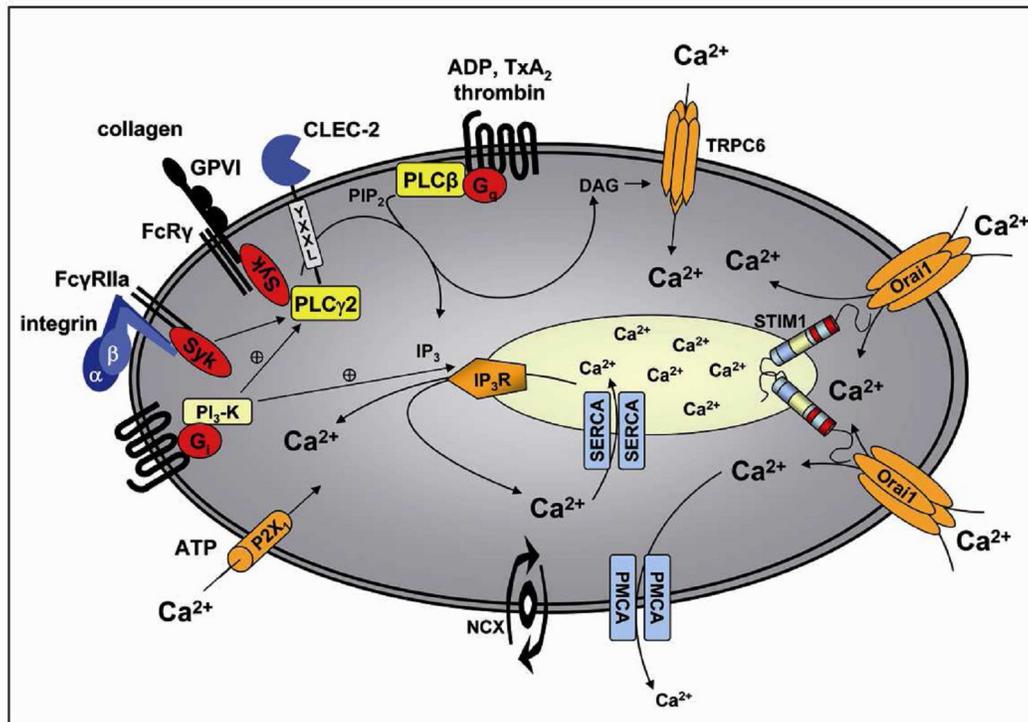
Fisiologicamente, em plaquetas humanas, os agonistas provocam a elevação da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  de duas formas: promovendo a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  dos estoques intracelulares e também a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  do meio extracelular através de membrana plasmática (JARDÍN e col., 2008; BERGMEIER e STEFANINI, 2009).

A estimulação induzida por diferentes agonistas dos receptores plaquetários leva à ativação de isoformas de fosfolipase (PLC), que hidrolisam fosfoinositol-4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) formando inositol-1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) e 1,2-diácil-glicerol (DAG).  $\text{IP}_3$ , por sua vez, induz a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular dos estoques intracelulares, enquanto DAG está envolvido na entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a partir do

meio extracelular (Figura 6). Nas plaquetas, três subfamílias das enzimas PLC são expressas, nomeadamente PLCb, PLCg e PLCd (ROSADO e SAGE, 2002; JARDÍN e col., 2008; VARGA-SZABO e col., 2009).

IP<sub>3</sub> estimula a liberação de Ca<sup>+2</sup> através da interação com o receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R). Estes receptores são encontrados em três isoformas (IP<sub>3</sub>-R1, IP<sub>3</sub>-R2 e IP<sub>3</sub>-R3) com diferentes papéis na mobilização de Ca<sup>+2</sup>, e em plaquetas todas as isoformas já foram descritas, sendo IP<sub>3</sub>-R1 e IP<sub>3</sub>-R2 as predominantes (JARDÍN e col., 2008). Alterações na concentração de Ca<sup>+2</sup> no sistema tubular denso interferem com a atividade de STIM1, uma proteína transmembrana, presente na membrana do sistema tubular denso, descrita como uma molécula “sensor de Ca<sup>+2</sup>”. O domínio da proteína STIM1 voltado para o lúmen do sistema tubular denso permanece normalmente ligado ao Ca<sup>+2</sup>, a saída deste íon para o citoplasma perturba esta interação, levando a mudanças no domínio externo de STIM1 (citoplasmático) e posterior ativação de Orai1, um dos principais canais de Ca<sup>+2</sup> na superfície plaquetária, permitindo assim a entrada de Ca<sup>+2</sup> do meio extracelular para o citoplasma. DAG também está envolvido na entrada de Ca<sup>+2</sup> do meio extracelular através da ativação de TRPC6 na membrana plasmática (ROSADO e SAGE, 2002; JARDÍN e col., 2008; VARGA-SZABO e col., 2009; BERGMEIER e STEFANINI, 2009).

A diminuição de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> é realizada principalmente pelas SERCAs, Ca<sup>+2</sup>-ATPases de retículos sarcoplasmático/endoplasmático, que devolve o Ca<sup>+2</sup> para o sistema tubular denso e pela extrusão realizada pelas PMCAs, Ca<sup>+2</sup>-ATPases (ROSADO e SAGE, 2002; JARDÍN e col., 2008; VARGA-SZABO e col., 2009).



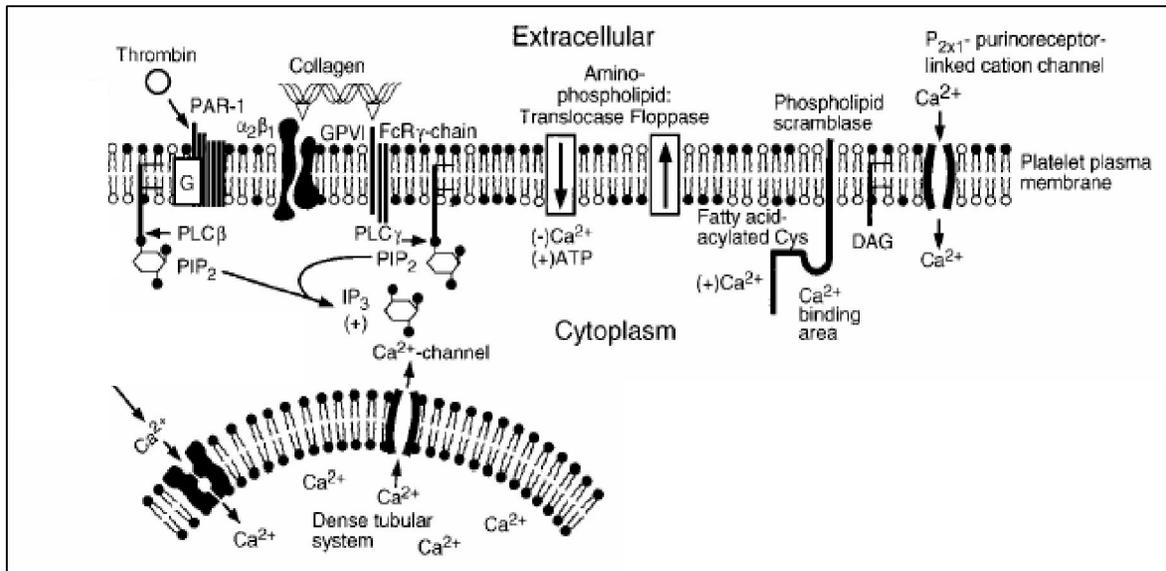
### **Figura 6: Mobilização de cálcio intracelular plaquetário.**

Após a ativação por diferentes receptores, isoformas de fosfolipase C (PLC) hidrolisam fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> libera Ca<sup>+2</sup> intracelular dos estoques intracelulares e, por sua vez STIM1 abre os canais Orai1 na membrana plasmática. DAG medeia a entrada de Ca<sup>+2</sup> através de TRPC6. Além disso, ocorre um acionamento direto dos canais de Ca<sup>+2</sup> P2X1, e de um trocador Na<sup>+</sup>/ Ca<sup>+2</sup> (NCX) que contribui para a elevação da [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>. Funcionando de forma contrária mecanismos que envolvem SERCAs e PMCAs, que bombeiam o íon Ca<sup>+2</sup> de volta para os estoques ou através da membrana plasmática, respectivamente. IP<sub>3</sub>R indica receptor de IP<sub>3</sub>; ATP, adenosina trifosfato, ADP, adenosina difosfato; GPVI, Glicoproteína VI; FcRg, Fc receptor g cadeia; FcγRIIa, Fc receptor IIa g; CLEC-2, receptor lectin-like tipo C 2; Pi3-K, fosfatidilinositol 3-quinase.

Adaptado de VARGA-SZABO e col., 2009

### 1.3.3 Superfície plaquetária

A superfície de plaquetas ativadas no “tampão” plaquetário é considerada de grande importância para a coagulação na hemostase (SOLUM, 1999; MONROE, 2002). A mudança morfológica é também acompanhada pela redistribuição de fosfolípidos plaquetários. Em plaquetas humanas, os fosfolípidos são distribuídos de forma heterogênea na bicamada fosfolipídica (GOODWIN e col., 1994; MONROE, 2002). Nas plaquetas não ativadas, a monocamada interna da membrana contém a maioria dos aminofosfolípidos e quase toda fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (fosfolípidos aniônicos), mas quando ocorre o evento de ativação plaquetária, esta ativação induz a liberação de estoques intracelulares de cálcio bem como a abertura de canais para este íon. O aumento na concentração de  $Ca^{+2}$  intracelular inibe uma aminofosfolípido translocase responsável pela manutenção da assimetria na distribuição dos fosfolípidos aniônicos e concomitantemente ativa uma fosfolípido “scramblase” que transporta rapidamente fosfatidilserina para a parte externa da membrana das plaquetas (Figura 7), esses fosfolípidos carregados negativamente formam nas plaquetas ativadas uma superfície pró-coagulante (KALAFATIS e col., 1994; HAWINGER e col., 1994; SOLUM, 1999). Como discutido nas próximas seções, este último evento é um dos principais elos entre as plaquetas e o sistema de coagulação.



**Figura 7:** Representação esquemática das reações que levam a expressão da superfície pró-coagulante em plaquetas focando o papel do íon cálcio neste processo.

Os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  aumentam devido ao aumento do transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular mediado por canais de  $\text{Ca}^{+2}$ , por difusão através de poros na membrana, por inibição de  $\text{Ca}^{+2}$ ATPases, e por combinação de estimuladores fisiológicos como a trombina e colágeno. A estimulação por trombina e colágeno culmina na produção de  $\text{IP}_3$ , que por sua vez, é capaz de abrir canais de  $\text{Ca}^{+2}$  em um sistema de membrana intracelular chamado de sistema tubular denso, que serve como um depósito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Como já mencionado no texto o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular é de fundamental importância para a formação da superfície pró-coagulante plaquetária.

Adaptado de *SOLUM*, 1999.

### 1.3.4 Mecanismo de ativação plaquetária

As respostas plaquetárias podem ser classificadas em dois tipos: adesão e agregação plaquetária, as quais estão relacionadas às diferentes funções plaquetárias *in vivo*. Inicialmente, ocorre adesão, “shape change” e agregação plaquetária reversível e, posteriormente ocorre a secreção de grânulos e agregação plaquetária irreversível. A irreversibilidade da agregação está relacionada à exposição do receptor de fibrinogênio e sua associação contínua com a plaqueta.

A adesão de plaquetas à matriz subendotelial é mediada pelo vWf e colágeno presente na matriz subendotelial, a interação do vWf é mediada através do domínio N-terminal de 45 kDa da GPIb $\alpha$  plaquetária, e é essencial para a captura da mesma, a interação do vWf com a GP IIb/IIIa estabiliza a adesão, a estabilização desta adesão também acontece devido à interação do colágeno com a GP  $\alpha_2\beta_1$  e GP IIb/IIIa (via vWf) (NIESWANDT e WATSON, 2003).

Seguindo a adesão, as plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos, que podem ser de três tipos: a-) os grânulos densos, contendo ADP, ATP, serotonina e cálcio; b-) os grânulos alfa, contendo proteínas adesivas (fibrinogênio, vWf, fibronectina etc), fatores da coagulação (fator V e fator XI); c-) e os grânulos lisossomais, contendo enzimas hidrolíticas. As plaquetas também sintetizam tromboxana A2 (TXA2) através da cascata do ácido araquidônico. O conteúdo liberado pelos grânulos como ADP e serotonina, agem em conjunto com TXA2 no recrutamento adicional de plaquetas para o sítio de injúria vascular. A interação plaqueta-plaqueta que ocorre no crescimento do “tampão” hemostático é

mediada pela ligação bivalente do fibrinogênio (proteína solúvel no plasma) a GP IIb/IIIa. Esta glicoproteína só é expressa na superfície de plaquetas ativadas (MONROE e col., 2002; NIESWANDT e WATSON, 2003; ANDREWS e BERNDT, 2004; ITALIANO e BATTINELLI, 2009).

Muitos agonistas plaquetários promovem suas respostas através de um mecanismo de transdução de sinal que envolve a ativação da fosfolipase C. Esta enzima converte fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), um tipo de fosfolípido presente na bicamada da membrana das plaquetas, em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). O DAG ativa proteína quinase C (PKC), e o IP<sub>3</sub> se liga a canais de Ca<sup>+2</sup> presentes na membrana do sistema tubular denso (que serve de reservatório intracelular de Ca<sup>+2</sup> plaquetário), proporcionando assim, a saída de íons Ca<sup>+2</sup> deste compartimento, aumentando a sua concentração no citoplasma (OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004). O aumento do Ca<sup>+2</sup> citosólico inicia a atividade da actomiosina ATPase, processo este que, induz a exposição de mais integrinas na superfície da plaqueta e uma reorganização do citoesqueleto resultando no processo chamado de “shape change” (BERGMEIER e STEFANINI, 2009). O aumento de Ca<sup>+2</sup> também ativa a fosfolipase A<sub>2</sub>, que gera ácido araquidônico através da clivagem de fosfolípidos de membrana. A enzima ciclooxigenase-1 (COX-1), presente nas plaquetas, converte ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos (prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) e prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)). A enzima tromboxana sintase, converte estes endoperóxidos em tromboxana A<sub>2</sub>. Estes produtos da COX-1 plaquetários (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>), são potentes vasoconstritores e ativadores plaquetários. Por se ligarem aos seus receptores específicos plaquetários, eles ativam mecanismos, via proteína G

acopladas a fosfolipase C, deste modo, completando um “feedback” positivo no processo de ativação (VANE e BOTTING, 2003; DUBOIS e col., 2004; FAZIO e LINTON, 2004).

Somente agonistas plaquetários fortes, como a trombina, ativam diretamente a fosfolipase C, enquanto agonistas mais fracos, como a epinefrina, ativam fosfolipase A2 e deste modo, ativam indiretamente fosfolipase C, através da formação de tromboxana A2 endógena (REGAN e col., 1986; OFUSO e NYARKO, 2000).

## **1.4 Coagulação sanguínea**

A coagulação sangüínea envolve a ativação seqüencial de uma série de reações enzimáticas, na qual o produto de cada reação converte uma proteína plasmática inativa (zimogênio) em um produto ativo, com exceção dos fatores V e VIII, que são co-fatores não enzimáticos (Figura 9). Cada zimogênio é convertido em uma forma ativa através da hidrólise de uma ou duas ligações peptídicas culminando na geração de uma grande quantidade de trombina (BOURIN e LINDAHL, 1993; DAVIE e col., 1991). Por convenção, os fatores de coagulação são denominados por algarismos romanos e após sua ativação são denominados pelo seu símbolo seguido da letra “a” (WRIGHT, 1962). As quantidades relativas dos fatores da coagulação encontrados no plasma humano bem como dos seus principais inibidores são apresentados na Tabela 2.

O mecanismo hemostático conduz a reações pró-coagulantes de extrema relevância envolvendo três complexos enzimáticos cuja funções dependem de vitamina K: o complexo “protrombinase”, o complexo “tenase intrínseco” e o complexo “tenase extrínseco”. Cada complexo é composto de serino-proteases e um cofator protéico não enzimático. Durante a coagulação sangüínea, estes complexos se organizam junto à superfície da membrana da plaqueta ativada resultando na ativação dos zimogênios, fator X e protrombina (KALAFATIS e col., 1994; MANN, 1999; SOLUM, 1999; MONROE e col., 2002; RENNÉ e col., 2009). Os complexos protrombinase e tenase intrínseco contêm componentes derivados do plasma, enquanto que o complexo tenase extrínseco possui componentes de origem celular ou tecidual (KALAFATIS e col., 1994) (Figura 6).

A produção de  $\alpha$ -trombina é acionada por duas diferentes vias que conduzem à ativação do fator X, através de clivagem proteolítica da ligação R52/I53 na sua cadeia pesada (DAVIE e col., 1991; HERTZBERG, 1994). Atualmente, o processo de coagulação tem sido revisto e muitos estudos têm proposto um mecanismo que seria dividido em duas fases: a fase de iniciação, disparada pela exposição do fator tecidual, uma proteína de 37 KDa associada à membrana de células extravasculares podendo ainda ser expressa por células vasculares como monócitos, macrófagos e células endoteliais (GRIGNANI e MAIOLO, 2000). O fator tecidual exposto associa-se ao fator VIIa presente no sangue (cerca de 1 a 2 % do fator VII total; MORRISSEY e col, 1993) formando o complexo denominado “tenase extrínseco” (Figura 8) que ativa o fator X (KALAFATIS e col., 1994; RENNÉ e col., 2009). O complexo “tenase extrínseco”

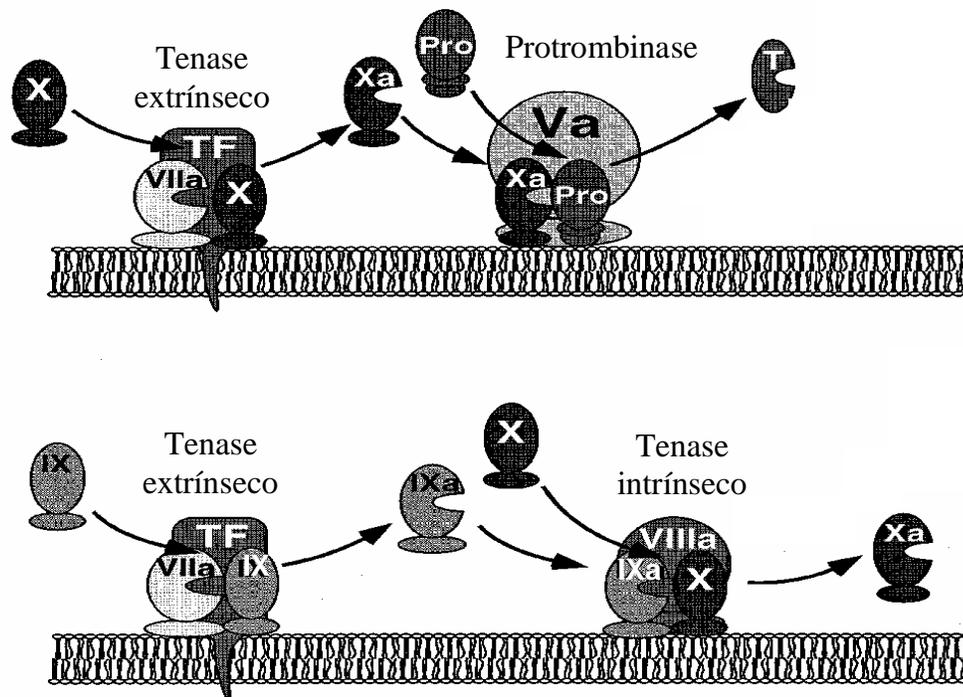
apresenta uma meia-vida curta no plasma devido à rápida inibição pelo TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*) e serviria para iniciar o processo de coagulação, ao passo que a via de propagação manteria uma produção mais prolongada de  $\alpha$ -trombina (MANN e col., 1998; MANN, 1999; MONTEIRO e col., 2001).

A segunda fase seria a fase de propagação, controlada pela  $\alpha$ -trombina que ativa os fatores XI, V e VIII. O fator XIa ativa o fator IX, e o fator IXa forma um complexo com o fator VIIIa, fosfolípidos e cálcio denominado complexo “tenase intrínseco” (Figura 8), o complexo tenase intrínseco ativa o fator X de forma idêntica ao complexo tenase extrínseco, porém apresentando uma eficiência catalítica cerca de 50 vezes maior (AHMAD e col., 1992) A ativação do fator V gerando o fator Va (SUZUKI e col., 1982) e a associação com o fator Xa na superfície de células ativadas, em uma reação dependente de cálcio, forma o complexo denominado “protrombinase” (Figura 8), este complexo passa, então, a ser o principal responsável pela ativação da protrombina. O complexo “tenase intrínseco”, apresenta uma organização estrutural similar ao complexo protrombinase (KALAFATIS e col., 1994 a,c; MONROE e col., 2002; BUDDAI e col., 2002; BRUFATTO e NESHEIN, 2003).

**Tabela 2: Fatores da coagulação e inibidores presentes no plasma.**

<b>Fator ou inibidor</b>	<b>Peso molecular (Da)</b>	<b>Concentração média no plasma (nM)</b>
Antitrombina	59.000	2.300
Cof. II da heparina	66.000	1200
Fator V	330.000	20
Fator VII	50.000	10
Fator VIII	330.000	0,7
Fator IX	56.000	90
Fator X	59.000	170
Fator XI	160.000	30
Fator XII	80.000	375
Fibrinogênio	340.000	8.800
Precalcreína	100.000	450
Proteína C	62.000	60
Proteína S	80.000	300
Protrombina	72.000	1.400
TFPI	34.000 e 41.000	2,5

Adaptado de MANN, 1999.



**Figura 8:** Complexos enzimáticos associados a superfícies celulares.

A formação dos complexos tenase extrínseco, tenase intrínseco e protrombinase em superfícies celulares levando à formação dos fatores IX e X ativados (IXa e Xa, respectivamente) e de trombina.

Abreviações: TF- tissue factor (Fator tecidual); PRO - protrombina; T – trombina.

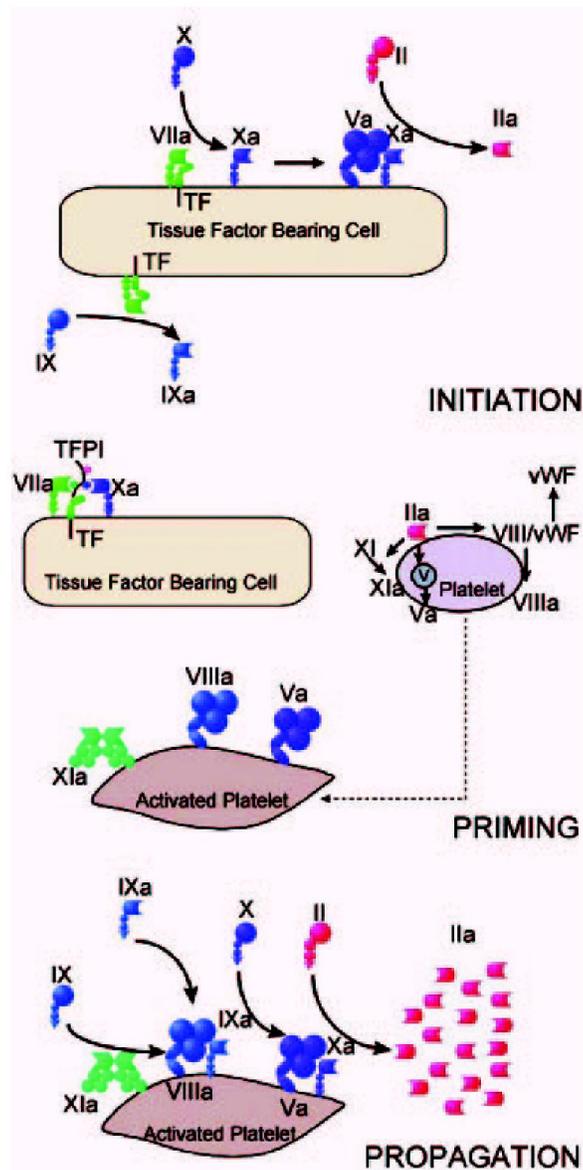
Adaptado de *ESMON, 2000*.

A  $\alpha$ -trombina é a única enzima gerada no processo de coagulação capaz de converter o fibrinogênio em fibrina. Este processo é mediado por proteólise limitada sobre a molécula de fibrinogênio, uma proteína solúvel do plasma que é

então convertido em um monômero de fibrina. Os monômeros de fibrina interagem entre si através de interações eletrostáticas formando uma rede insolúvel, porém instável de fibrina. A consolidação deste polímero é feita pela ação do fator XIIIa, uma enzima que também é ativada pela  $\alpha$ -trombina, que une covalentemente as moléculas de fibrina presentes na rede instável (MUSZBEK e col., 1996; MOSESSON, 1998; BIANCHINI e col., 2002; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003). A trombina também ativa os fatores da coagulação sanguínea V, VIII, XI e XIII amplificando, assim sua própria produção (FURIE e FURIE, 1992; MONROE e col., 2002; BIANCHINI e col., 2002).

## 1.5 Trombina

A  $\alpha$ -trombina é uma serino-protease pertencente à família da tripsina, consistindo em um heterodímero de 36 kDa ligado por uma ponte dissulfeto (FENTON e col., 1977). A forma humana da enzima é constituída por uma cadeia A de 36 resíduos e uma cadeia B de 259 resíduos, na qual se encontra o sítio catalítico formado pelos resíduos H43, D99 e S205, conservado em outras serino-proteases. A preferência para clivagem de ligações peptídicas após resíduos de arginina é dada pela presença do resíduo D199 no sítio de especificidade primária, localizado próximo ao centro ativo da enzima. Entretanto, apesar da grande homologia entre a estrutura primária da  $\alpha$ -trombina e outras serino-proteases da família da tripsina, sua especificidade é muito maior e atribuída a detalhes estruturais peculiares (STUBBS e BODE, 1993, GUILLIN e col., 1995; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003).



**Figura 9: Cascata de coagulação.**

A coagulação sangüínea envolve a ativação seqüencial de uma série de reações enzimáticas, na qual o produto de cada reação converte uma proteína plasmática inativa (zimogênio) em um produto ativo, designado pela letra “a”. Cada zimogênio é convertido em uma forma ativa através da hidrólise de uma ou duas ligações peptídicas culminando na geração de uma grande quantidade de trombina (IIa). Esta enzima cliva fibrinogênio em fibrina insolúvel.

*Adaptado de SCHNEIDER e SOBEL, 2008.*

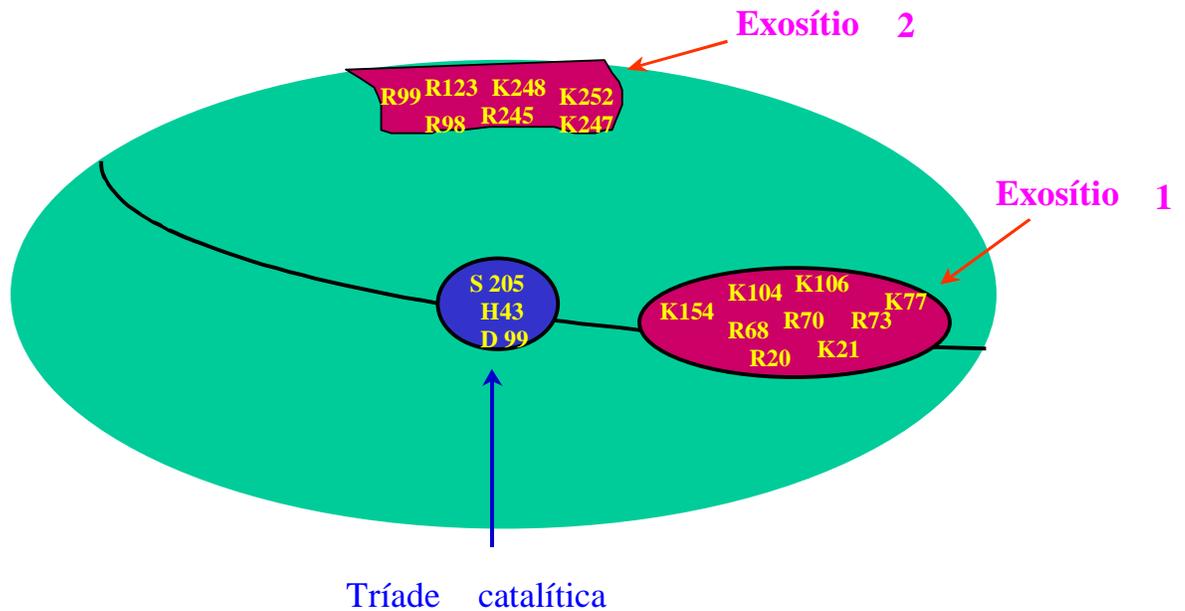
O sítio catalítico da  $\alpha$ -trombina é descrito como uma fenda mais profunda e estreita que o da tripsina sendo apontado como o primeiro fator limitante ao acesso de substratos macromoleculares e inibidores (BODE e HUBER, 1992; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; HUNTINGTON, 2009). A atividade catalítica da  $\alpha$ -trombina é finamente controlada por seus domínios de reconhecimento, distantes do sítio catalítico (exosítios), junto com alças (loops), que regulam a especificidade da enzima e a interação com substratos macromoleculares (DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003). Certos números de resíduos básicos expostos na superfície da enzima formam dois pólos com forte potencial eletropositivo em regiões opostas ao sítio catalítico da enzima (Figura 10) e são denominados exosítios de ligação de ânions (STUBBS e BODE, 1993; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; HUNTINGTON, 2009).

O exosítio I (FRS) de ligação de ânions foi primariamente associado ao reconhecimento do fibrinogênio sendo também conhecido como “sítio de reconhecimento do fibrinogênio”. Este domínio também desempenha papel crucial no reconhecimento de outros ligantes, incluindo substratos macromoleculares, moduladores e inibidores. A figura 10 apresenta os aminoácidos classicamente descritos como integrantes do exosítio I de ligação de ânions. Além do importante papel no reconhecimento de substratos, moduladores e inibidores, diversos estudos têm demonstrado que a interação de diferentes ligantes com o exosítio I causa mudanças conformacionais no sítio catalítico da  $\alpha$ -trombina (LIU e col., 1991b; YE e col., 1991; YE e col., 1992; MONTEIRO e col., 1999; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; HUNTINGTON e BAGLIN, 2003). Estas modificações

estruturais alteram a especificidade da enzima e acredita-se que isto seja importante na modulação de suas funções biológicas.

O exosítio II (HBS) de ligação de ânions é também conhecido como sítio de ligação à heparina. Ele se localiza próximo a uma hélice na região C-terminal da cadeia B da  $\alpha$ -trombina (SHEEHAN e SADLER, 1994; GIBBS e col., 1995; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003). Estudos cristalográficos também demonstraram que o exosítio II de ligação de ânions interage com o fragmento 2 da protrombina (ARNI e col., 1993). Esta interação altera a conformação do sítio catalítico da enzima (BOCK, 1992; LIAW e col., 1998). Adicionalmente foi demonstrado que a interação do fragmento 2 da protrombina com o exosítio II também altera a conformação do exosítio I (DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; HUNTINGTON e BAGLIN, 2003; DI CERA, 2003). Acredita-se que estas modificações possam ter um papel fisiológico relevante.

Como discutido acima, a trombina tem um papel central no processo de coagulação. Ela apresenta ainda diversas funções biológicas, como: funções pró e anticoagulante, participa dos processos de reparo tecidual, inflamação, resposta imune, metástase, aterosclerose entre outras, demonstrando que seu papel não é restrito ao sistema de coagulação, sendo esta enzima envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos (ESMON, 2000; DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; HUNTINGTON e BAGLIN, 2003; HUNTINGTON, 2009).



**Figura 10: Modelo estrutural da α-trombina.**

Principais domínios envolvidos na estrutura e função da α-trombina. Os peptídeos que compõe o sítio catalítico e os exosítios I e II estão destacados.

Adaptado de *GUILLIN e col., 1995.*

**1.6 Controle da hemostasia**

O balanço entre o sangramento e a trombose é mantido pela rápida e localizada amplificação das proteases da coagulação no sítio de injúria vascular e pelos mecanismos que inibem a ação das proteases em outra parte que não seja no local da lesão (HUNTINGTON e BAGLIN, 2003).

O sistema fibrinolítico representa um importante mecanismo de controle impedindo acúmulo de fibrina na luz do vaso. Enzimas ativadoras de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) e tipo tecidual (t-PA) convertem o plasminogênio em plasmina, que é sua forma ativa. A plasmina, uma vez formada, cliva a fibrina e deste modo gera um novo resíduo C-terminal de lisina que estimula ainda mais a formação de plasmina (BOUMA e MEIJERS, 2003). A fibrina é transformada em fragmentos solúveis, que possuem atividade antitrombótica. Estes fragmentos solúveis competem com a fibrina pelos sítios ligantes de polímeros de fibrina do trombo formado e também com fibrinogênio por sítios ligantes de glicoproteína IIb/IIIa na superfície de plaquetas, dificultando assim todo o processo de coagulação (LOSCALZO e SCHAFER, 2003).

A ativação do plasminogênio e a atividade da plasmina são reguladas por outras moléculas membros da classe das serpinas como a  $\alpha_2$ -antiplasmina e o inibidor do ativador de plasminogênio (tipos I e II), que inibem, respectivamente, a plasmina e os ativadores de plasminogênio, através da formação de complexos estequiométricos de 1:1 com estas enzimas ativas (LOSCALZO e SCHAFER, 2003).

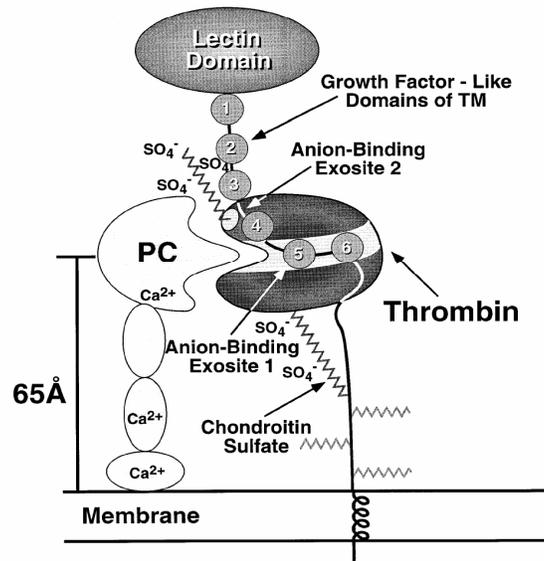
A presença de múltiplos inibidores plasmáticos como, por exemplo, antitrombina, proteína C e S, e o inibidor da via do fator tecidual, são também de extrema importância, pois coletivamente mantêm a fluidez do sangue (DAVIE e col., 1991; ZAVALOVA e col., 2002; QUINSEY e col., 2004). Estes inibidores plasmáticos agem através de mecanismos diversos.

A antitrombina (58 kDa) é uma glicoproteína sintetizada no fígado, e que circula no plasma com uma meia-vida de aproximadamente 3 dias. Ela forma complexos com fatores da coagulação, onde seus principais alvos são a trombina, o fator Xa e o fator IXa (DAVIE e col., 1991; MONTEIRO, 2001; HUNTINGTON e BAGLIN, 2003) e sua atividade é aumentada em aproximadamente 3000 vezes na presença de heparina (MONTEIRO, 2001; QUINSEY e col., 2004). Outro inibidor que também pertence à família das serpinas é o cofator II da heparina. Esta proteína é sintetizada no fígado, com cerca de 66 kDa, e apresenta uma meia-vida de aproximadamente 2,5 dias no plasma. Sua ocorrência é descrita somente em mamíferos. Ao contrário da antitrombina, este inibidor possui atividade específica contra a trombina. O cofator II da heparina, também descrito em outras espécies, apresenta sua atividade aumentada por heparina e dermatan sulfato (ESMON e col., 1999, 2000; HUNTINGTON e BAGLIN, 2003).

A via da proteína C é uma importante via inibitória, na qual a proteína C se liga ao complexo trombomodulina–trombina no endotélio vascular, e é convertida pela trombina em uma protease ativa (Figura 11). A trombomodulina é um receptor que é exposto na superfície de células endoteliais intactas, e se liga ao exsítio I da trombina, fazendo com que a enzima perca a especificidade pelo fibrinogênio (HUNTINGTON e BAGLIN, 2003; CASTELLINO e PLOPIS, 2009). A  $\alpha$ -trombina cliva a ligação R169-I170 na proteína C gerando a proteína C ativada, (APC) que rapidamente se dissocia do complexo  $\alpha$ -trombina-trombomodulina e forma um novo complexo com a proteína S na superfície de células endoteliais, plaquetas e talvez outros tipos celulares (ESMON, 2000; HACKENG e col., 2009) (Figura 12). O complexo formado por APC e proteína S atua sobre o fator Va clivando

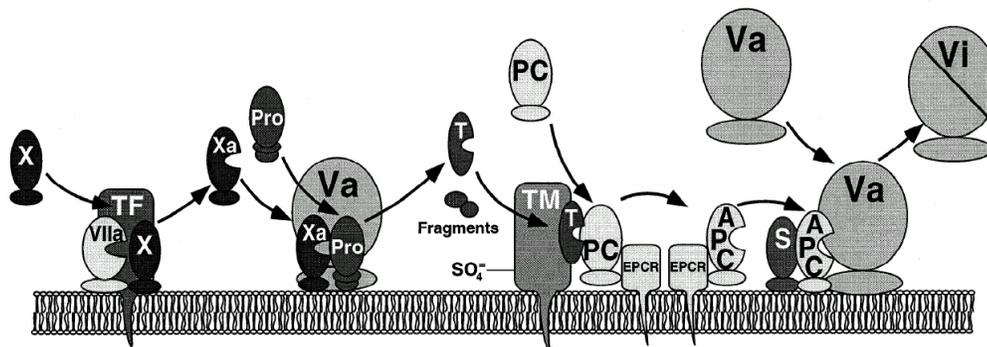
rapidamente a ligação R506-G507, o que reduz drasticamente sua atividade de cofator no complexo protrombinase e conseqüentemente diminuindo a razão de ativação da protrombina. Uma segunda clivagem na ligação R306-N307 do fator Va determina a dissociação de suas subunidades e inativa completamente o cofator (ESMON, 2000; CASTELLINO e PLOPIS, 2009). De forma similar, o complexo APC-proteína S cliva a ligação peptídica R336-M337, inativando o fator VIIIa e reduzindo seu efeito de cofator no complexo tenase intrínseco (FURLAN, 2002; REZAIE, 2003; DI CERA, 2003; HACKENG e col., 2009).

Os inibidores responsáveis pela inativação da proteína C ativada são  $\alpha_1$ -antitripsina, inibidor de proteína C e  $\alpha_2$ -macroglobulina. A deficiência de qualquer uma dessas proteínas (C ou S) leva, como se poderia prever, a estados de hipercoagulabilidade (ESMON e col., 1999, 2000; HACKENG e col., 2009).



**Figura 11:** Esquema da estrutura do complexo  $\alpha$ -trombina-trombomodulina interagindo com a proteína C.

Representação da interação entre os domínios EGF-like (5 e 6) e da cadeia de condroitin sulfato, integrantes da trombomodulina, com o exossítio I e II da trombina, respectivamente. Reproduzido de *ESMON*, 2000.



**Figura 12:** Via da proteína C ativada.

Representação do esquema de ativação da proteína C (PC), ligada ao seu receptor de células endoteliais (EPCR), pelo complexo formado entre a trombomodulina (TM) e a  $\alpha$ -trombina (T). A proteína C ativa (APC) se liga à proteína S (S) formando um complexo que inativa o fator Va. Reproduzido de *ESMON*, 2000.

## 1.7 Trombose

O processo hemostático ativado inespecificamente pode resultar na oclusão de vasos sanguíneos levando à trombose, sendo esta a causa primária ou secundária de ataques cardíacos, derrames, embolia pulmonar e trombose venosa profunda, patologias de alta morbidade e mortalidade em países desenvolvidos (ESMON, 2000; HORAN e col., 2001; GRESELE e AGNELLI, 2002, MACKMAN, 2008).

Nos E.U.A., mais de dois milhões de pessoas morrem todo ano de trombose arterial ou venosa ou de suas conseqüências (GOLDHABER, 2009). Segundo os dados do Ministério da Saúde (2004), no Brasil, o grupo de doenças cardiovasculares constitui a primeira causa de mortalidade, sendo responsável por 80% das mortes no ano de 2003.

As causas predisponentes da trombose venosa profunda foram descritas por Virchow em 1856 e incluem: estase sangüínea; injúria vascular; e alterações dos fatores de coagulação do sangue, levando à hipercoagulabilidade. Os diversos fatores de risco, sejam adquiridos ou herdados, atuam através de pelo menos um dos três componentes da tríade de Virchow, e o seu reconhecimento auxilia no diagnóstico e profilaxia da doença tromboembólica (ESMON, 2000; HORAN e col., 2001).

Estudos mostram que as doenças cardiovasculares estão integradas a fatores de risco herdados e/ou adquiridos (MARTINELLI, 2001; SIMMONDS e col., 2001). Sendo assim, muitas condições clínicas podem estar associadas com o alto risco de trombose arterial, venosa e tromboembolia. A aterosclerose, a

hipertensão e diabetes são algumas condições clínicas relacionadas com a trombose arterial, enquanto que a cirurgia geral, a cirurgia ortopédica, o trauma e o câncer estão entre as condições associadas com episódios de trombose venosa (BICK e FAREED, 1997; MACKMAN, 2008).

A trombose arterial é geralmente iniciada por ruptura mecânica ou espontânea de placas ateroscleróticas, um processo que expõe material trombogênico no arcabouço rico em lipídeos da placa de ateroma no sangue. O trombo arterial que é formado em condições de fluxo rápido, é composto por plaquetas agregadas junto com rede de fibrina.

O trombo venoso consiste principalmente de fibrina e células vermelhas. A trombose venosa se desenvolve em condições de fluxo lento, e geralmente se origina em veias musculares profundas de membros inferiores. A coagulação nesses sítios é iniciada por trauma vascular e é aumentada por estase venosa (WEITZ e HIRSH, 2001).

A tromboembolia venosa é uma desordem hemostática grave, devido as suas complicações como a embolia pulmonar e a síndrome pós-traumática. Determinantes genéticos associados à tromboembolia venosa ainda não são totalmente conhecidos, mas desde a década passada houve um considerável progresso nos estudos para um melhor entendimento dos fatores de risco desta doença assim como de seus respectivos problemas clínicos (MARTINELLI, 2001).

Estados associados à formação patológica de trombos têm sido prevenidos e/ou tratados através do uso de anticoagulantes como heparina, heparinas de baixo peso molecular e análogos da vitamina K e com agentes

inibidores de agregação plaquetária, como a aspirina e o ticlopidina. O tratamento de trombos já formados pode ainda ser feito com fármacos fibrinolíticos como a estreptoquinase, o ativador de plasminogênio tecidual e a uroquinase. Entretanto esses tratamentos apresentam limitações como à recorrência de eventos trombóticos e possíveis quadros hemorrágicos (WEITZ e HIRSH, 2001).

Além disso, a prevenção à estenose após o procedimento de revascularização ainda não foi obtida, nem com o estabelecimento de um procedimento preventivo e nem com o uso de agentes antiplaquetários. A necessidade de monitoramento laboratorial contínuo no tratamento com heparina ou warfarina é igualmente, considerado desvantajoso. Diante das limitações dos chamados agentes antitrombóticos de primeira geração e, apesar do progresso com os chamados agentes de segunda geração, diversos antitrombóticos são constantemente estudados, contribuindo para a expansão do conhecimento sobre a fisiopatologia da agregação das plaquetas e ativação da coagulação (Tabela 3) (GRESELE e AGNELLI, 2002; MACKMAN, 2008).

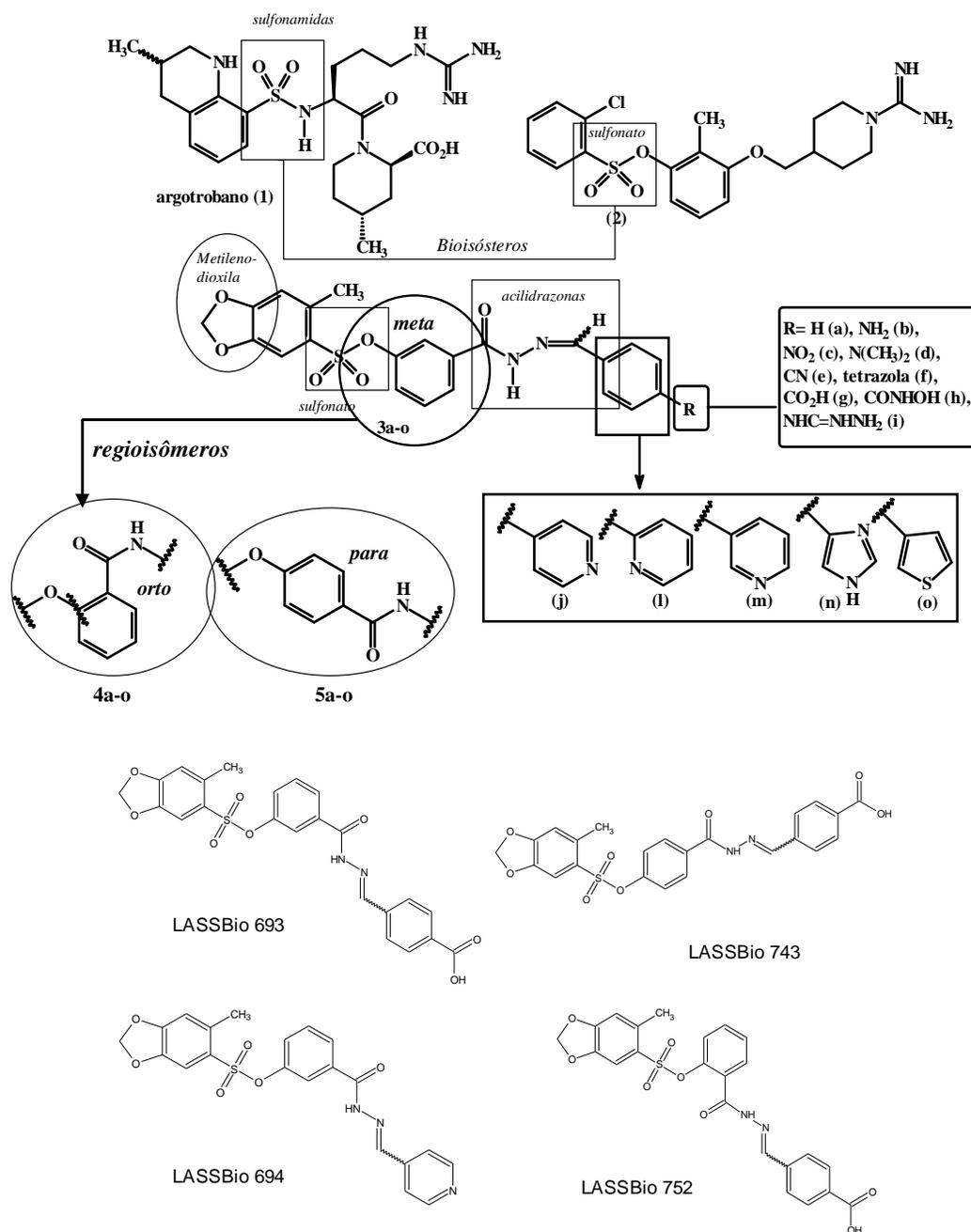
### **TABELA 3: Agentes antitrombóticos**

	Agentes antiplaquetários	Agentes anticoagulantes
Primeira geração	Aspirina Thienopiridina (ticlopidina e clopidogrel).	Heparina Warfarina
Segunda geração	Antagonistas de GP IIb/IIIa  Combinação Aspirina-clopidogrel Inibidores de interação FvW-GPIb	Heparina de baixo peso molecular Hirudina  Inibidores da via F. tecidual-FVIIa
Última geração	Inibidores de interação colágeno-plaqueta  Inibidores da ativação trombina-induzida  Antagonistas diretos de receptor de ADP  Compostos antiplaquetários liberadores de óxido nítrico	Inibidores seletivos do Fator Xa  Inibidores seletivos de Trombina  Proteína C ativada humana  Trombomodulina Recombinante solúvel

*Adaptado de GRESELE e AGNELLI, 2002*

## 1.8 Derivados acilhidrazônicos

Os novos derivados sulfonatos-hidrazônicos (3a; 4a; 5a; 3a-o) foram planejados através de modificações moleculares na estrutura dos protótipos inibidores de trombina 1 e 2 e sintetizados a partir do safrol (*Ocotea Pretiosa*), produto natural brasileiro abundante. Estas modificações, baseadas em estratégias de simplificação molecular e bioisosterismo, foram empregadas visando o desenho de uma nova série de compostos bioativos de padrão estrutural original, permitindo sua eventual proteção patentária. A inclusão da subunidade metilenodioxila, proveniente da matéria-prima sintética, i.e. safrol, foi proposta a fim de se estudar as contribuições eletrônicas desta unidade estrutural para a otimização da atividade antitrombina desejada. Ademais, a presença do grupamento sulfonato foi contemplada por analogia ao inibidor de trombina da literatura (Figura 13), visando garantir a atividade sobre os receptores de trombina. Posteriormente, realizou-se a introdução da subunidade hidrazônica em diferentes posições do anel fenila central, objetivando investigar a seletividade dos novos derivados frente aos diferentes processos que resultam no fenômeno de agregação plaquetária (BARREIRO e col., 2004, LIMA e col., 2008).



### **Figura 13: Estratégia de preparação dos derivados acilhidrazônicos.**

Esquema simplificado de estratégia de preparação dos derivados acilhidrazônicos. Os compostos (3a; 4a; 5a; 3a-o) foram planejados através de modificações moleculares na estrutura de inibidores de trombina e sintetizados a partir do safral (Ocotea Pretiosa). Os compostos mais utilizados neste trabalho foram: LASSBio 693 (3 g); LASSBio 694 (3 j); LASSBio 743 (4 g) e LASSBio 752 (5 g).

## 2.1. Objetivos Gerais

Em várias condições patológicas, eventos envolvendo proteínas plasmáticas e plaquetas são desencadeadas provocando a formação de trombos. A alta incidência de trombose permanece ainda como a principal causa de morte nas sociedades ocidentais, apesar de correntes tratamentos antitrombóticos (Gresele e Agnelli, 2002; Ubatuba, 1989; Murray e Lopes, 1997). Isto pode ser observado através do crescimento contínuo de artigos científicos publicados sobre o estudo de trombose (Gresele e Agnelli, 2002).

Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a atividade antitrombótica e anti-plaquetária dos compostos 4'-carboxi-benzilideno-carboidrazida-6-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonato (LASSBio 693) e seus regioisômeros (LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752).

## 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antiplaquetária de compostos derivados acilhidrazônicos em plaquetas de coelho;
- Selecionar os compostos de melhor atividade em inibir a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas de várias espécies;
- Testar a atividade dos compostos sobre a agregação plaquetária induzida por agonistas dos receptores PAR-1 e PAR-4;
- Testar a atividade catalítica da trombina na presença desses compostos, usando fibrinogênio e S-2238 como substratos;
- Avaliar a atividade desses compostos nos fatores da coagulação, através do ensaio de tempo de recalcificação *in vitro*;
- Estabelecer um modelo, *in vivo*, de tromboembolia pulmonar induzido por colágeno e norepinefrina e avaliar o potencial antitrombóticos dos compostos neste modelo;
- Estabelecer um modelo, *in vivo*, de tromboembolia pulmonar induzido por trombina humana, e avaliar o potencial antitrombótico dos compostos neste modelo;
- Analisar o potencial antitrombótico dos compostos;
- Avaliar o risco hemorrágico desses compostos através do ensaio de tempo de hemorragia induzida (THI);
- Avaliar os efeitos do composto L-752 sobre a coagulação sanguínea, utilizando os ensaios, *ex vivo*, de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT).

## 3.1. Animais

Os experimentos com animais foram realizados utilizando-se camundongos BALB-c (ambos os sexos) pesando entre 18 e 25 g. Os animais foram mantidos em jejum, por duas horas, antes da administração dos compostos. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e Committee on Animal Research and Ethics (CARE) e aprovados pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ (IBqM 004). Os animais foram mantidos em condições de higiene adequada, com ração e água *ad libitum* no biotério do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## 3.2. Metodologia

### 3.2.1 Isolamento da $\alpha$ -Trombina Humana

A  $\alpha$ -trombina foi purificada a partir de amostras congeladas de plasma humano citratado, seguindo protocolo previamente estabelecido (NGAI e CHANG, 1991). As amostras de plasma (em geral perfazendo um volume total de 1 L) foram descongeladas à 37 °C e o material transferido para uma câmara refrigerada (4 °C) onde se adicionou lentamente, sob agitação, uma solução de 1M de BaCl<sub>2</sub> (1/20, v/v) e benzamidina (5 mM, final). Em seguida, o material foi centrifugado a 4500 rpm (4 °C), por fim, dialisado contra tampão 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 100 mM de EDTA. O material

dialisado foi então submetido a duas etapas de precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-35 % e 35-70%). Após centrifugação da amostra, o *pellet* obtido na segunda etapa de precipitação foi ressuspenso e dialisado contra tampão 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 7,5 aproximadamente por 24 horas. A amostra foi incubada com veneno bruto de *Oxyuranus scutellatus* 60 minutos a 37°C e posteriormente, aplicado em uma coluna de heparina-agarose (1 x 10 cm, SIGMA). O material retido foi eluído de forma gradativa, com o aumento da força iônica utilizando-se tampão 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EGTA, pH 7,5, sendo monitorado pela absorbância a 280 nm. As frações correspondentes à  $\alpha$ -trombina foram reunidas, concentradas no sistema Amicon e mantidas a -70°C até seu uso. O grau de pureza da proteína purificada foi verificado por eletroforese em gel de poli-acrilamida (12 %) em condições desnaturantes e não redutoras, onde apresenta uma banda majoritária correspondente a 36 kDa. A concentração protéica foi estimada por absorbância a 280 nm (FENTON e col., 1977). A atividade da enzima foi estimada através da capacidade de hidrólise do substrato sintético S-2238 bem como da capacidade de promover a coagulação do fibrinogênio bovino purificado.

### **3.2.2 Ensaio de Fibrinocoagulação**

O ensaio de fibrinocoagulação foi realizado de acordo com o método descrito por RIBEIRO e col. (1995), utilizando o leitor de microplacas Thermomax (Molecular Devices, Menlo Park, USA). Diluições seriadas de alíquotas dos compostos (em DMSO) foram feitas em um volume final de 25  $\mu\text{L}$  (800  $\mu\text{M}$  inicial)

em tampão RB (Tris 50 mM, NaCl 0,15M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, PEG 0,1%, pH 7,5) e acrescidas com 25 µL de α-trombina humana (8 nM) a 37 °C. O ensaio foi iniciado após a adição de 50 µL de fibrinogênio bovino 4 mg/mL ressuspendido no mesmo tampão RB. A absorbância a 405 nm foi monitorada por 20 minutos a 37 °C, em intervalos de 6 segundos. A absorbância máxima obtida ao final desse tempo foi comparada com os controles contendo somente trombina e fibrinogênio.

### **3.2.3 Atividade Amidolítica da Trombina**

O ensaio de atividade amidolítica foi também realizado utilizando o leitor de microplacas. Diluições seriadas de alíquotas das amostras foram feitas em um volume final de 25 µL (800 µM) em tampão RB (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, PEG 0,1%, pH 7,5) e acrescidas com 25 µL de α-trombina humana (8 nM) a 37 °C. O ensaio foi iniciado após a adição de 50 µL de substrato cromogênico sintético (400 µM), específico para trombina (S-2238), ressuspendido no mesmo tampão RB. A absorbância a 405 nm foi monitorada por 20 minutos a 37 °C, em intervalos de 6 segundos. A absorbância máxima obtida ao final desse tempo foi comparada com os controles contendo somente trombina e S-2238.

### **3.2.4 Tempo de recalcificação**

Sangue humano foi coletado em tubos com vácuo com 3,8 % de citrato de sódio (9:1 v/v). O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi preparado por centrifugação em 3500 rpm por 12 minutos e o “pellet” foi retirado. O ensaio foi

realizado utilizando-se um coagulômetro (Amelung KC4). O volume de 50 µL de PPP foi adicionado ao tubo de ensaio, específico do aparelho, seguido da adição de 50 µL da amostra (800 µM) ou PBS (usado como controle). Após um minuto, a reação foi disparada com a adição de 100 µL de CaCl<sub>2</sub> (25 mM) e o tempo necessário para ocorrer a coagulação do plasma foi medido.

### **3.2.5 Agregação Plaquetária (Plaquetas de Coelho)**

O sangue, retirado da artéria central da orelha de coelhos saudáveis, foi misturado a uma solução de citrato 3,8% (9:1 v/v). O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação em 800 rpm por 10 minutos, estando pronto para ser utilizado nos ensaios usando-se os agonistas colágeno, ADP, trombina e ácido araquidônico. Para preparar as plaquetas lavadas (FRANCISCHETTI e col., 1998), o sangue foi misturado a uma solução de EDTA 0,2 M, e centrifugado a 800 rpm, separado o sobrenadante (PRP) e, logo após, o PRP foi centrifugado em 1500 rpm para separar as plaquetas dos outros componentes do plasma. O sobrenadante foi descartado e então as plaquetas foram ressuspensas em tampão Tyrode (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 33 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,03 mM, Glicose 5,6 mM, gelatina 0,35%, pH 6,5), contendo EGTA 0,02 mM e recentrifugadas em 3000 rpm por 2X. Depois da última centrifugação as plaquetas foram ressuspensas em tampão Tyrode (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 33 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,03 mM, Glicose 5,6 mM, gelatina 0,35%, pH 7,4). A agregação foi realizada *in vitro* utilizando-se um agregômetro Chrono-log (Havertown, PA, USA), trombina humana (2 nM) foi usada como agonista. 4 µL de

CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) foi adicionado a cada cubeta 30 segundos antes da adição dos compostos. Os compostos e DMSO (0,5 % v/v), que foi usado como veículo para os compostos, foram adicionados 1 minuto antes do agonista. Indometacina foi usada como controle positivo, por ser um inibidor já conhecido da agregação plaquetária.

### **3.2.6 Agregação Plaquetária (Plaquetas Humanas)**

Sangue humano foi coletado em tubos de vácuo com EDTA (0,2 M) ou citrato de sódio (3,8 %) (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação em 800 rpm por 10 minutos. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi preparado por centrifugação, 3500 rpm por 12 minutos. As plaquetas lavadas foram obtidas por método de centrifugação (SOSLAU e col., 2001). Agregação plaquetária foi monitorada por método turbidimétrico de BORN e CROSS, 1963 utilizando-se um agregômetro Chrono-log (Havertown, PA, USA). PRP (400 µL) foi incubado a 37° C por 1 minuto. A agregação plaquetária foi induzida por trombina (10 µM), TRAP-1 –SFLLRNP- (16,4 µM), TRAP-4A –AYPGKF- (0,25 mM), colágeno (1,6 µg/ml) e ADP (5 µM). LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752, foram ressuspensos em DMSO (0,5 % v/v), e adicionados (52,5-195 µM final) 1 minuto antes da adição dos agentes agregantes. A indometacina também foi usada como padrão nestes ensaios. Para todos os testes uma curva inicial com os diferentes agonistas foi realizada. A concentração

do indutor escolhida para análise foi aquela que provocou 80-90 % de agregação plaquetária.

### **3.2.7 Agregação Plaquetária (Plaquetas de rato)**

Ratos Wistar pesando entre 200 e 250 g foram previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg, intramuscular), seguida por ketamina (100 mg/kg, intramuscular). O sangue foi coletado através de punção cardíaca em tubos com EDTA (0,2 M) ou citrato de sódio 3,8 % (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação em 800 rpm por 10 minutos. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi preparado por centrifugação, 3500 rpm por 12 minutos. As plaquetas lavadas foram obtidas por método de centrifugação (SOSLAU e col., 2001). Agregação plaquetária foi monitorada por método turbidimétrico de BORN e CROSS, 1963 utilizando-se um agregômetro Chrono-log (Havertown, PA, USA). PRP (400 µL) foi incubado a 37° C por 1 minuto. A agregação plaquetária foi induzida por trombina (10 nM), TRAP-4A –AYPGKF- (0,25 mM) e ADP (5 µM). LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752, foram ressuspensos em DMSO (0,5 % v/v), e adicionados (50-200 µM final) 1 minuto antes da adição dos agonistas. Indometacina foi usada como controle positivo nestes ensaios. Para todos os testes foi realizada uma curva inicial (com concentrações distintas), com os diferentes agonistas. A concentração do indutor escolhida para análise foi aquela que provocou 80-90 % de agregação plaquetária.

### 3.2.8 Mensuração de cálcio citoplasmático

As plaquetas humanas lavadas foram obtidas por método de centrifugação (SOSLAU e col., 2001) e incubadas a 37 °C, no escuro, com 3 µM de FURA2-AM por 45 minutos. Após o período de incubação as plaquetas foram lavadas duas vezes com tampão Tyrode (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 33 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,03 mM, glicose 5,6 mM, albumina 0,35%, pH 6,5), contendo EGTA 0,02 mM. Após as lavagens as plaquetas foram ressuspensas em tampão Tyrode, sem EGTA, e ajustadas para 1 x 10<sup>8</sup> plaquetas/mL. A monitorização da [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> mobilizados em plaquetas humana foi através da leitura de fluorescência do FURA2-AM ligado ao cálcio em um fluorímetro (Hitachi F – 4500). Para as leituras foram utilizadas cubetas de poli-meta-acrílico, o volume lido foi de 1,0 mL e a temperatura de 37 °C. As plaquetas marcadas com FURA2-AM foram pré-incubadas sob agitação durante 1 minuto com 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, a após este tempo incubadas também por 1 minuto na presença dos derivados acilhidrazônicos, nas concentrações testadas (50, 100 e 200 µM), antes da adição de trombina 1 UI/mL, TRAP-1 –SFLLRNP- (16 µM) e TRAP-4A –AYPGKF- (0,5 mM). A monitorização da fluorescência foi realizada com comprimento de onda de excitação de 340 nm e de emissão 505 nm, slit de excitação 5,0 e de emissão 2,5 e voltagem de 950 vts.

### 3.2.9 Citometria de fluxo

Plasma rico em plaquetas foi primeiramente separado através da centrifugação de sangue total humano a 800 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 20 µL foram então incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 40 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-PAR 1 humano (sc-13503, Santa Cruz Biotechnology Inc.), na presença de 200 µM dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743, LASSBio 752 ou Indometacina, todos preparados sempre em um volume final de 6 µL. O controle de marcação plaquetária foi feito através da marcação com anticorpo anti-P-selectina. Um controle de marcação positiva também foi realizado apenas na presença do mesmo volume de DMSO, solvente utilizado para diluição dos compostos acima mencionados. As amostras foram então lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com 20 µg/mL de anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado à ficoeritrina (sc-3738, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Após serem lavadas novamente com PBS, as amostras foram finalmente adquiridas em um citômetro de fluxo BD FACScan (Becton, Dickinson and Company) (total de 10.000 eventos por amostra), e os dados coletados analisados pelo programa BD CellQuest Pro™ (Becton, Dickinson and Company).

Um controle de marcação secundária não-específica foi feito incubando-se uma amostra diretamente com anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado à ficoeritrina.

### **3.2.10 Ensaio de tromboembolia pulmonar induzida por colágeno e norepinefrina**

A atividade antitrombótica foi determinada usando camundongos BALB-c de ambos os sexos (18-25 g). Após um período de jejum de 60 minutos, os compostos foram administrados oralmente (100  $\mu\text{mol/kg}$ ; 0,1 ml/20g) para os animais com uma suspensão em Goma arábica 5% (veículo). A indometacina (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) foi usada como controle positivo. Eventos trombóticos foram induzidos por injeção intravenosa de uma suspensão de colágeno (0,5 mg/mL) e norepinefrina (0,5 mg/mL) e a taxa de mortalidade foi determinada 15 minutos após a indução da trombose contando o número de animais sobreviventes, para cada composto foram usados 3 grupos contendo 10 animais cada um (GRESELE e col, 1998).

A metodologia foi estabelecida usando-se várias concentrações de suspensão de colágeno e norepinefrina, a concentração escolhida como controle para análise foi aquela que proporcionou entre 80-90 % de mortalidade em um intervalo de 15 minutos após a administração do estímulo trombótico.

### **3.2.11 Ensaio de tromboembolia pulmonar induzida por trombina**

A atividade antitrombótica foi determinada usando camundongos BALB-c de ambos os sexos (18-25 g). Após um período de jejum de 60 minutos, os

compostos foram administrados oralmente (100 µmol/kg; 0,1 ml/20g) para os animais com uma suspensão em Goma arábica 5% (veículo). A indometacina (100 µmol/kg) foi usada como controle positivo. Eventos trombóticos foram induzidos por injeção intravenosa de trombina humana (2000 UI/Kg) e a taxa de mortalidade foi determinada 15 minutos após a indução da trombose contando o número de animais sobreviventes, para cada composto foram usados 3 grupos contendo 5 animais cada um (GRESELE e col., 1998; MOMI e col., 2001).

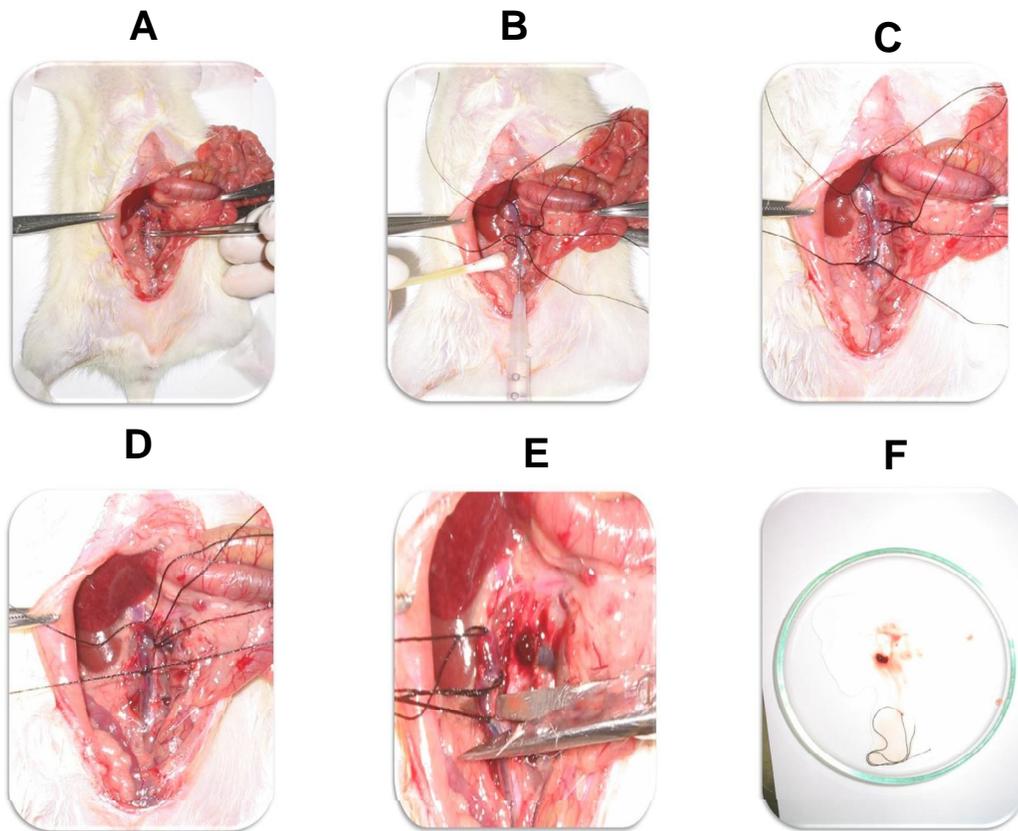
A metodologia foi estabelecida usando-se várias concentrações de trombina e a concentração escolhida para análise foi aquela que proporcionou entre 80-90 % de mortalidade em um intervalo de 15 minutos após a administração do estímulo trombótico.

### **3.2.12 Trombose venosa induzida por estase e hipercoagulabilidade**

A formação de trombo através da combinação de estase e hipercoagulabilidade foi induzida como descrito por VOGEL e col., (1989) com ligeiras modificações (FARIAS, 2000). Ratos Wistar pesando entre 200 e 250 g foram previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg, intramuscular), seguida por ketamina (100 mg/kg, intramuscular). O abdomen dos ratos foi cirurgicamente aberto, e a veia cava, entre as veias renais e as ilíacas, foi cuidadosamente exposta e dissecada dos tecidos adjacentes. Foi delimitado um segmento de 1 cm na veia cava, utilizando fios de algodão (100 % algodão) com nós frouxos, nas seguintes posições: na veia renal esquerda e na veia cava, logo abaixo da

ramificação da veia renal (posição cranial), e um centímetro abaixo do nó frouxo posicionado na veia cava cranial (abaixo da ramificação da veia renal), próximo à ramificação das veias ilíacas (posição caudal).

Os compostos ou veículo (animais controle) foram administrados, por via oral. Após os tempos indicados nas figuras, tromboplastina cálcica (3mg/kg de peso corporal) foi administrada, por via intravenosa, abaixo do nó frouxo, próximo às ilíacas. Em seguida foi feita a estase apertando-se o nó frouxo da veia renal esquerda para a indução da formação do trombo. Após 20 minutos da indução do trombo, fez-se a ligadura dos nós frouxos na veia cava (posições cranial e caudal). O trombo, formado no segmento de 1 cm ocluído, foi removido e lavado com tampão fosfato salina pH 7,5, seguido por citrato de sódio 3,18 %. Depois de lavado, o trombo foi mantido em estufa a 60 °C por aproximadamente 1 hora para secagem e determinação posterior do peso seco (Figura 14).



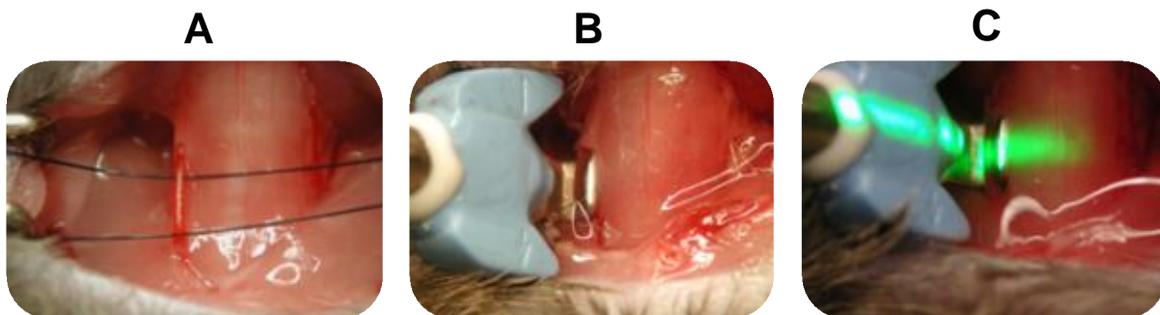
**Figura 14:** Procedimento do modelo de trombose venosa profunda induzida por estase e hipercoagulabilidade.

Etapas de dissecação da veia cava em animal. Isolamento do segmento (A, B) e indução da formação de trombo após a administração de 3 mg/kg trombolastina (C). Após 20 minutos de estase o trombo é retirado (D,E) e seu peso é mensurado (F) como descrito em Metodologia. (Fotos: Bruno Ruta e Mariane Assafim).

### 3.2.13 Modelo de trombose arterial

A trombose na artéria carótida foi induzida utilizando um método modificado de EITZMAN, 2003. Ratos (ambos os sexos, entre 200 e 250 g de peso corporal) foram previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg, intramuscular) seguida

por ketamina (100 mg/kg, intramuscular). A artéria carótida direita foi isolada através de uma incisão na linha mediana cervical, e uma sonda de fluxo ultra-sônico (modelo 0,5 VB; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, E.U.A.) foi justaposta em volta da artéria. LASSBio 752 foi administrado, por via oral, em diversos intervalos de tempo, antes da indução da trombose. O corante Rosa de Bengala (90 mg / kg de peso corporal; Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, E.U.A.) foi injetado na veia cava inferior, imediatamente após a aplicação do laser 1,5 mW, 540 nm (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA, E.U.A.) na artéria carótida direita, de uma distância de 6 cm, o fluxo na artéria carótida foi monitorada até ocorrer a oclusão completa (Figura 15).



**Figura 15: Modelo de trombose arterial**

A artéria carótida foi isolada (A) e uma sonda de fluxo ultra-sônico (modelo 0,5 VB; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, E.U.A.) foi justaposta em volta da artéria (B). Um laser 1,5 mW, 540 nm (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA, E.U.A.) foi aplicado alguns milímetros antes do local de aplicação da sonda.

### **3.2.14 Ensaio de aPTT e PT *ex vivo***

Os ratos (200-250 g) foram anestesiados com xilazina e ketamina como nos protocolos anteriores. O sangue foi coletado por punção cardíaca, com citrato 3,8 %, nos tempos de 1, 2, 6, 15 e 24 horas após a administração da amostra, por via oral. Os tubos com as amostras foram centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm para obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP). No ensaio de aPTT, 50 µl de plasma foram incubados por 2 minutos com 50 µl de cefalina. A reação foi disparada com 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,025 M, em um volume final de 200 µL, a 37 °C. No ensaio de PT, 50 µl de plasma foram incubados por 2 minutos à 37 °C. A reação foi disparada com 100 µl de tromboplastina cálcica, em um volume final de 150 µL. Ambos os ensaios medem o tempo de coagulação do plasma em segundos a 37 °C.

O tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e o tempo de protrombina (PT) foram determinados em um coagulômetro Amelung KC4A (Alemanha).

### **3.2.15 Modelo de hemorragia induzida**

Neste modelo (HERBERT e col., 1996), os ratos (200-250 g) foram anestesiados com xilazina e ketamina como no protocolo de trombose venosa profunda. A administração dos compostos foi realizada por via oral nas concentrações e intervalos de tempo mostrados nas figuras. Após a administração dos compostos, nos intervalos de tempo determinados, a cauda do animal foi

cortada a 3 mm da sua extremidade e inserida em uma proveta contendo 40 mL de água destilada. Após a primeira hora do ensaio iniciado (corte da cauda), a densidade óptica (D.O.) foi medida por espectrofotometria a 540 nm (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 3000) a fim de se estimar o volume de sangue perdido através da absorbância da hemoglobina presente (Figura 16).



**Figura 16: Modelo de Hemorragia Induzido**

A administração das amostras foi realizada por via oral. Após 60 minutos, a cauda cortada do animal foi inserida em uma proveta contendo 40 mL de água destilada (A, B) como descrito em materiais e métodos. (Fotos: Renato Fernandes e Flávia Frattani)

### **3.3 Análise estatística**

Foi utilizado o software SigmaPlot for Windows version 8.0 (Copyright© 1986-1995 Jandel Corporation). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  SD e sua análise estatística foi obtida através da determinação da variância, seguida do teste de Bonferroni, com mudanças consideradas significativas, sendo *p*-valor menor ou igual a 0,05.

## 4.1 Agregação plaquetária em plaquetas de coelho

Foram sintetizados 10 compostos acilhidrazônicos que inicialmente foram testados no ensaio de agregação plaquetária, em plaquetas de coelho. Assim, todos os compostos da série foram testados e os resultados estão mostrados na Tabela 3. Os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743, LASSBio 752 e LASSBio 770 apresentaram resultados significativos quando trombina (2 nM) foi usada como agonista, tendo todos inibido a agregação plaquetária em mais de 70%. Os compostos LASSBio 694, LASSBio 744, LASSBio 750, LASSBio 751, LASSBio 752, LASSBio 770, LASSBio 774 e LASSBio 480, também obtiveram resultados significativos quando o agonista usado foi ácido araquidônico (100  $\mu$ M). Somente os compostos LASSBio 770, LASSBio 774 e LASSBio 480 apresentaram bons resultados quando a agregação foi induzida por colágeno (5  $\mu$ g/mL). Nenhum dos compostos da série obteve resultados relevantes quando a agregação plaquetária foi induzida por ADP (5  $\mu$ M).

Como nosso foco principal eram os compostos que obtivessem melhores resultados e que fossem mais seletivos em relação à inibição da trombina, somente os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 foram selecionados para dar prosseguimento aos estudos.

## Efeito dos compostos acilhidrazônicos sobre plaquetas de coelho

Compostos	Inibição (%)			
	Trombina (2 nM)	AA (100µM)	Colágeno (5 µg/mL)	ADP (5 µM)
<b>Indometacina</b>	40	97	96	4
LASSBio 693	95	0	0	0
LASSBio 694	72,5	82	25	0
LASSBio 743	80	0	0	0
LASSBio 744	0	97	42	0
LASSBio 750	0	80	11,5	0
LASSBio 751	0	80	37,5	0
LASSBio 752	100	80	25	0
LASSBio 480	1,3	100	100	22
LASSBio 770	81	100	100	36
LASSBio 774	2	100	100	32

**Tabela 4:** Agregação plaquetária, em plaquetas de coelho, induzida por: trombina (2 nM), ácido araquidônico (100 µM), colágeno (5 µg/mL) e ADP (5 µM). Os compostos foram testados na concentração de 150 µM.

Adaptado de *LIMA e col., 2008*.

## 4.2 Agregação plaquetária em plaquetas de rato

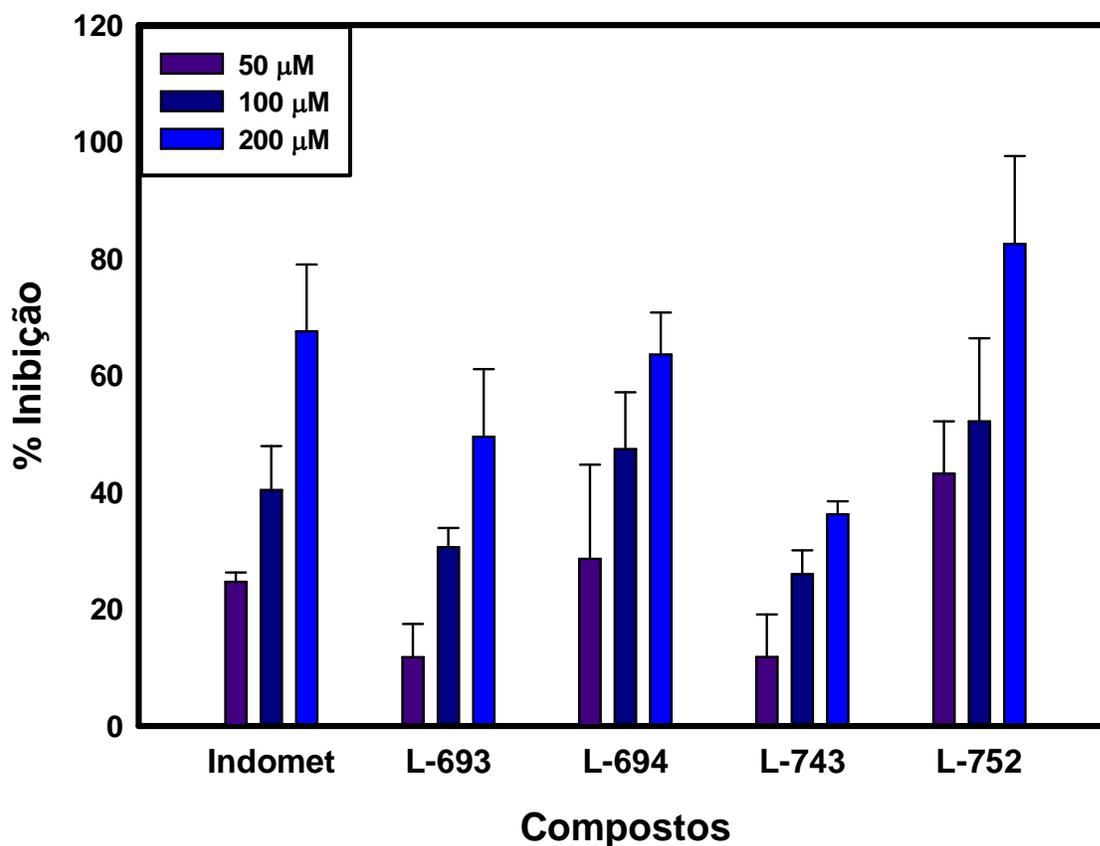
### 4.2.1 Indução por trombina

Nós testamos os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 em plaquetas de rato, de forma a avaliar seus efeitos em um sistema próximo da condição encontrada nos ensaios *in vivo*. A figura 17 mostra os resultados obtidos nos ensaios de agregação plaquetária usando trombina (10 nM) como agonista. Obtivemos  $49,5 \pm 11,6$  % de inibição na presença de LASSBio 693,  $63,6 \pm 7,2$  % na presença de LASSBio 694,  $36,3 \pm 2,3$  % na presença de LASSBio 743,  $82,6 \pm 15$  % na presença de LASSBio 752, todos na concentração de 200  $\mu$ M.

### 4.2.2 Indução por ADP

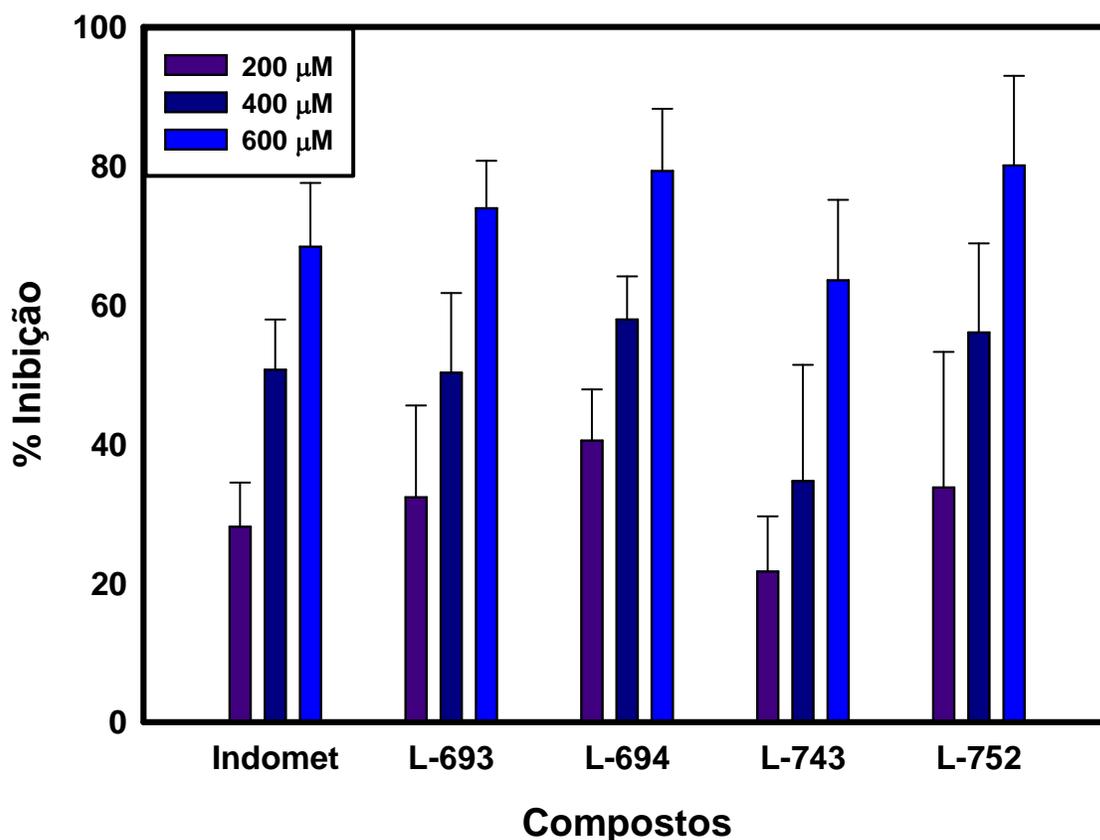
Apesar de buscarmos compostos específicos para trombina, resolvemos avaliar a atividade dos compostos na agregação plaquetária induzida por ADP, para observarmos se eles continuariam apresentando o mesmo perfil de inibição observado em plaquetas de coelho, uma vez que, nenhum dos quatro compostos foi capaz de inibir a agregação induzida por este agonista. A figura 18 mostra os resultados obtidos na agregação plaquetária induzida por ADP. Obtivemos em torno de  $73,9 \pm 6,8$  % de inibição na presença de LASSBio 693,  $79,2 \pm 8,9$  % de inibição na presença de LASSBio 694,  $63,5 \pm 11,5$  % de inibição na presença

de LASSBio 743 e  $80,1 \pm 12,9$  % de inibição na presença de LASSBio 752 porém, em concentrações muito maiores de  $600 \mu\text{M}$ .



**Figura 17:** Agregação plaquetária induzida por trombina (10 nM) em plaquetas de rato

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. A indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados.  $n = 3$  animais.



**Figura 18:** Agregação plaquetária induzida por ADP (5  $\mu\text{M}$ ) em plaquetas de rato

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. Indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados. n = 3 animais.

### 4.2.3 Indução por TRAP-4A

Como obtivemos resultados bastante positivos em relação à atividade de alguns compostos com relação à trombina, tentamos avaliar se esses compostos estariam interferindo diretamente na atividade da trombina ou atuando em nível

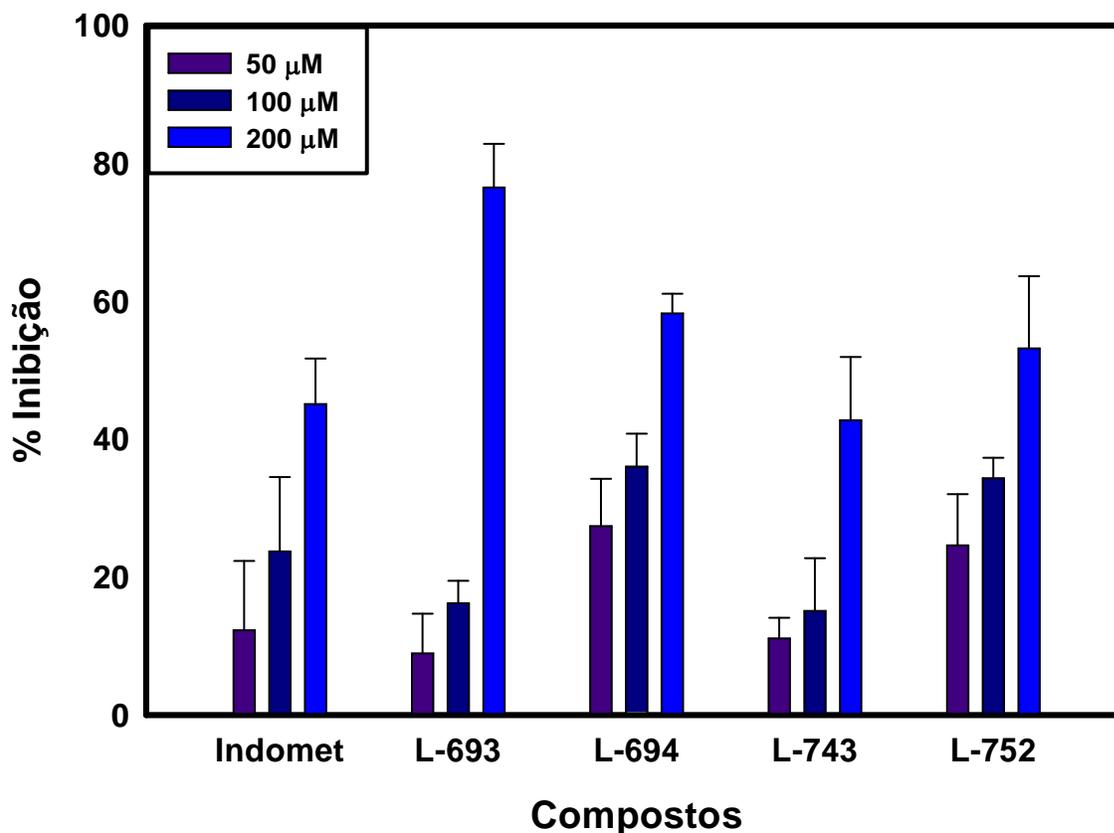
dos seus receptores plaquetários, ou ainda interferindo na resposta celular direta ao estímulo desses receptores, então, nós utilizamos um agonista sintéticos do receptor PAR-4: TRAP-4A (AYPGKF) (SOSLAU e col., 2001).

A figura 19 mostra os resultados obtidos nos ensaios de agregação plaquetária usando TRAP-4A (0,25 mM) como agonista. Todos os compostos inibiram a agregação plaquetária induzida pelo ativador de PAR-4. Obtivemos então  $76,5 \pm 6,3$ ,  $58,2 \pm 2,8$ ,  $42,7 \pm 9,1$  e  $53,2 \pm 11,4$  % de inibição na presença de LASSBio 693, 694, 743 e 752, respectivamente, todos na concentração de 200  $\mu$ M. A tabela 5 resume os dados de  $IC_{50}$  obtidos através das curvas dose-resposta de cada composto.

### **4.3 Atividade amidolítica da trombina**

Uma atividade dos derivados acilhidrazônicos diretamente sobre a trombina seria um dos possíveis mecanismos de ação desses compostos. Desta forma, a inibição da atividade catalítica da trombina pelos compostos foi avaliada através de ensaio usando substrato cromogênico S-2238, um substrato que é específico para trombina. Os resultados obtidos com este ensaio são mostrados na Figura 20. O composto LASSBio 693 mostrou uma grande atividade inibitória da atividade amidolítica da trombina, apresentando aproximadamente 90 a 100 % de atividade nas concentrações de 100 a 400  $\mu$ M. Este resultado sugere fortemente que somente este composto age diretamente sobre a trombina, modulando de alguma forma a atividade do seu sítio catalítico, uma vez que o

substrato S-2238, por ser pequeno, interage diretamente com o mesmo, sem aparentemente apresentar interação com nenhuma outra região da enzima. No entanto, os demais compostos não apresentaram atividade inibitória neste ensaio.



**Figura 19:** Agregação plaquetária induzida por TRAP-4A (AYPGKF) (0,25 mM) em plaquetas de rato

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. A indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados. n = 3 animais

## Valores de IC<sub>50</sub> calculados para agregação plaquetária (plaquetas de rato)

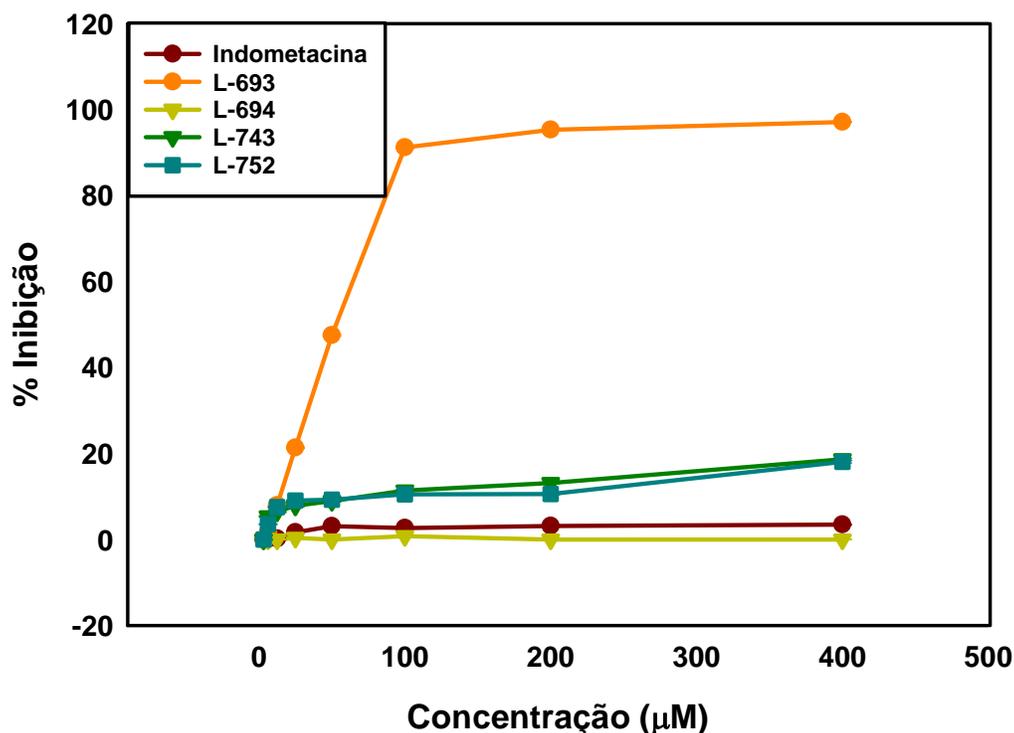
<b>Compostos</b>	<b>Trombina</b>	<b>TRAP-4A</b>	<b>ADP</b>
Indometacina	139,7 µM	ND (> 200 µM)	418,5 µM
L-693	184,7 µM	151,1 µM	394,8 µM
L-694	139 µM	158,8 µM	335,2 µM
L-743	ND (> 200 µM)	ND (> 200 µM)	497,0 µM
L-752	109,8 µM	171,6 µM	362,7 µM

**Tabela 5:** A tabela os valores de IC<sub>50</sub> calculados para indometacina e para os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752. Os valores referem-se aos ensaios apresentados nas figuras 17, 18 e 19.

### 4.4 Ensaio de fibrinocoagulação

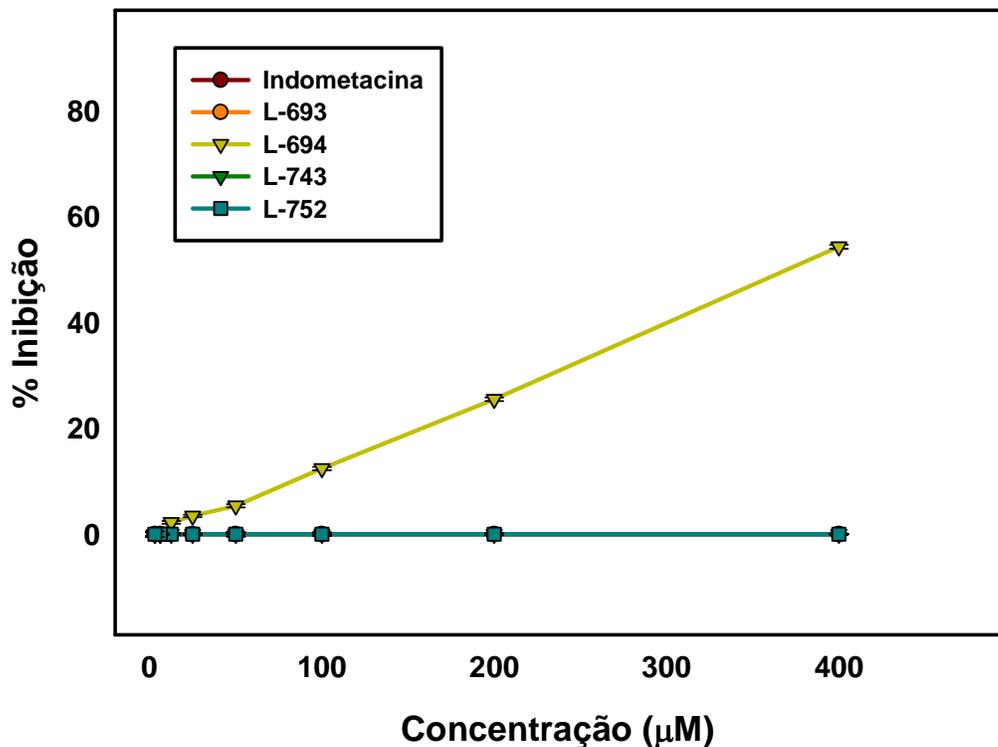
Para que a trombina consiga clivar o fibrinogênio, formando fibrina, é necessária uma interação inicial do fibrinogênio com o exosítio I da enzima e uma posterior clivagem através do sítio catalítico. Por isso, o passo seguinte foi utilizar o ensaio de fibrinocoagulação, onde avaliamos os efeitos dos compostos acilhidrazônicos sobre a atividade catalítica e também uma possível interação com o exosítio I da trombina. Os resultados obtidos na Figura 21 mostram a ação dos compostos neste ensaio.

Os compostos LASSBio 693, LASSBio 743, LASSBio 752 e a indometacina não mostraram atividade significativa. No entanto, o composto LASSBio 694 inibiu a clivagem do fibrinogênio em aproximadamente  $28 \pm 0,2 \%$ , na concentração de  $200 \mu\text{M}$  e em  $55 \pm 0,3 \%$  na concentração de  $400 \mu\text{M}$ , parecendo interferir diretamente com a trombina em concentrações mais altas. Uma vez que, esse composto não afetou o sítio catalítico da enzima (Figura 20), é possível que este efeito se deva a uma interferência na interação do fibrinogênio com o exossítio I da trombina.



**Figura 20:** Atividade catalítica da trombina medida através da clivagem de S-2238.

Diluições seriadas dos compostos foram feitas, a concentração mais alta usada foi de  $400 \mu\text{M}$  e a mais baixa de  $3,13 \mu\text{M}$ . A concentração de trombina humana usada foi de  $2 \text{ nM}$  e a de S-2238 foi de  $200 \mu\text{M}$ .  $n = 3$ .



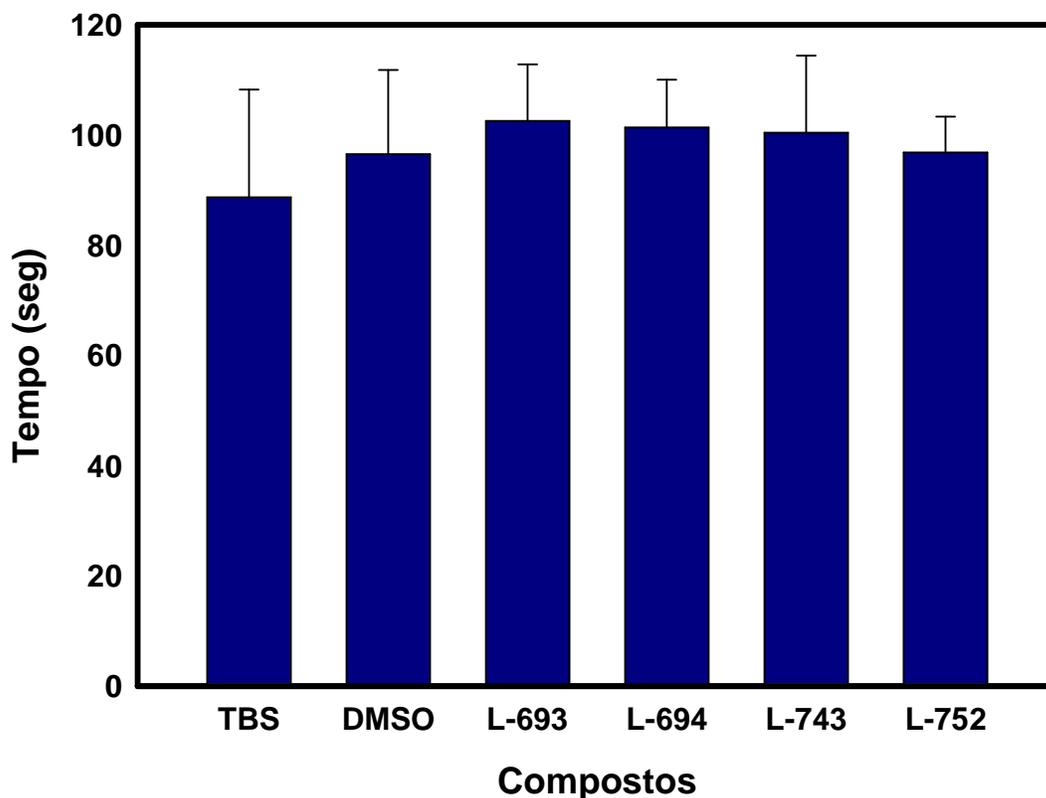
**Figura 21: Ensaio de fibrinocoagulação.**

Diluições seriadas dos compostos foram feitas, a concentração mais alta usada foi de 400 µM e a mais baixa de 12,5 µM. A concentração de trombina humana usada foi de 2 nM e a de fibrinogênio bovino foi de 2 mg/mL. As linhas vermelhas, laranja, verde e azul estão sobrepostas. n = 3.

## 4.5 Tempo de recalcificação em plasma de rato

Além da atividade destes compostos nos ensaios de agregação plaquetária e suas ações diretas sobre a trombina, resolvemos avaliar uma possível atividade sobre outros fatores da coagulação, em plasma de rato. Para isto, usamos plasma pobre em plaquetas (PPP), como mostrado na Figura 22. Os resultados mostram que *in vitro* não há nenhuma ação inibitória dos compostos

sobre o plasma pobre em plaquetas (PPP), e conseqüentemente em relação aos outros fatores de coagulação sanguíneos.



**Figura 22:** Tempo de recalcificação realizado com plasma pobre em plaquetas (PPP).

Todos os compostos foram usados próximos à concentração máxima usada no ensaio de agregação plaquetária. No grupo controle foi adicionado o mesmo volume de TBS no lugar dos compostos.

## 4.6 Tromboembolia pulmonar

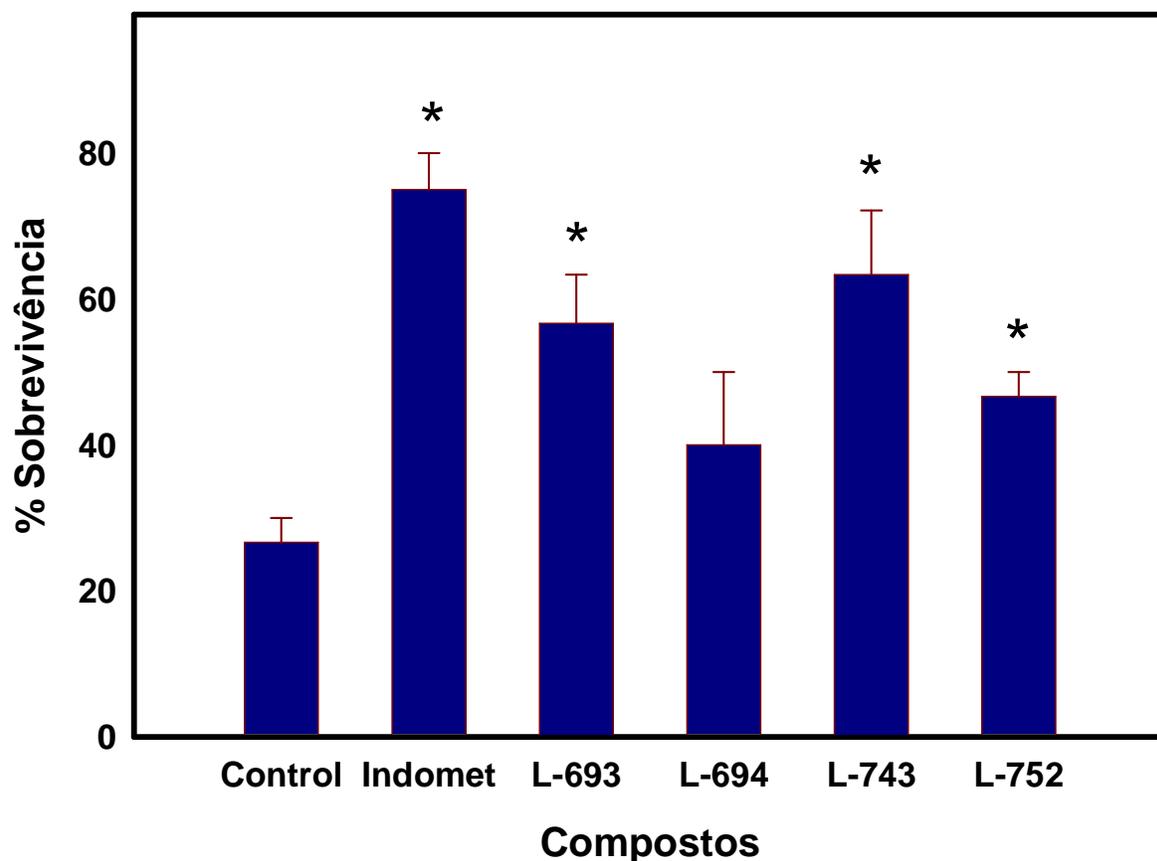
### 4.6.1 Indução por colágeno e norepinefrina

Iniciamos nossos estudos *in vivo* utilizando o modelo de tromboembolia pulmonar, em camundongos. O modelo onde a tromboembolia é induzida por colágeno (500 µg/mL) e norepinefrina (500 µg/mL) avalia principalmente a atividade plaquetária, uma vez que a injeção de colágeno mimetiza uma situação de injúria vascular, onde teríamos exposto o subendotélio que é rico em colágeno. Nestes casos, temos as plaquetas como primeiras células a se aderirem ao local da lesão, realizando a hemostasia primária. Nesse modelo foram usados três grupos com dez camundongos cada um, para cada composto testado, inclusive para o ensaio controle e para o composto usado como controle positivo (indometacina).

Os compostos e a indometacina foram administrados, por via oral, na concentração de 100 µmol/kg, uma hora antes da indução da tromboembolia pela administração intravenosa da suspensão contendo colágeno e norepinefrina.

A Figura 23 mostra os resultados obtidos, onde podemos observar que todos os compostos mostraram proteção neste modelo de trombose, sendo que os compostos LASSBio 693, LASSBio 743 e LASSBio 752 foram os mais potentes, aumentando significativamente a sobrevivência dos animais testados. Desta forma, verificamos uma proteção, na mortalidade, de  $55 \pm 3$ ,  $80 \pm 9$  e  $50 \pm 10\%$  na presença dos compostos LASSBio 693, LASSBio 743 e LASSBio 752 respectivamente, em relação a  $30 \pm 5\%$  de sobrevivência obtida para o grupo controle.

O composto LASSBio 694 se mostrou o menos potente apresentando  $38 \pm 2,3\%$  de sobrevivência.



**Figura 23:** Efeito dos compostos sobre a tromboembolia pulmonar induzida por colágeno e norepinefrina

Os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) foram administrados por via oral 1 hora antes da indução do trombo por injeção i.v. com colágeno (500  $\mu\text{g/mL}$ ) e norepinefrina (500  $\mu\text{g/mL}$ ). A indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados. Cada barra representa a média  $\pm$  SD de 3 grupos com 10 animais cada um.\*  $p < 0,05$

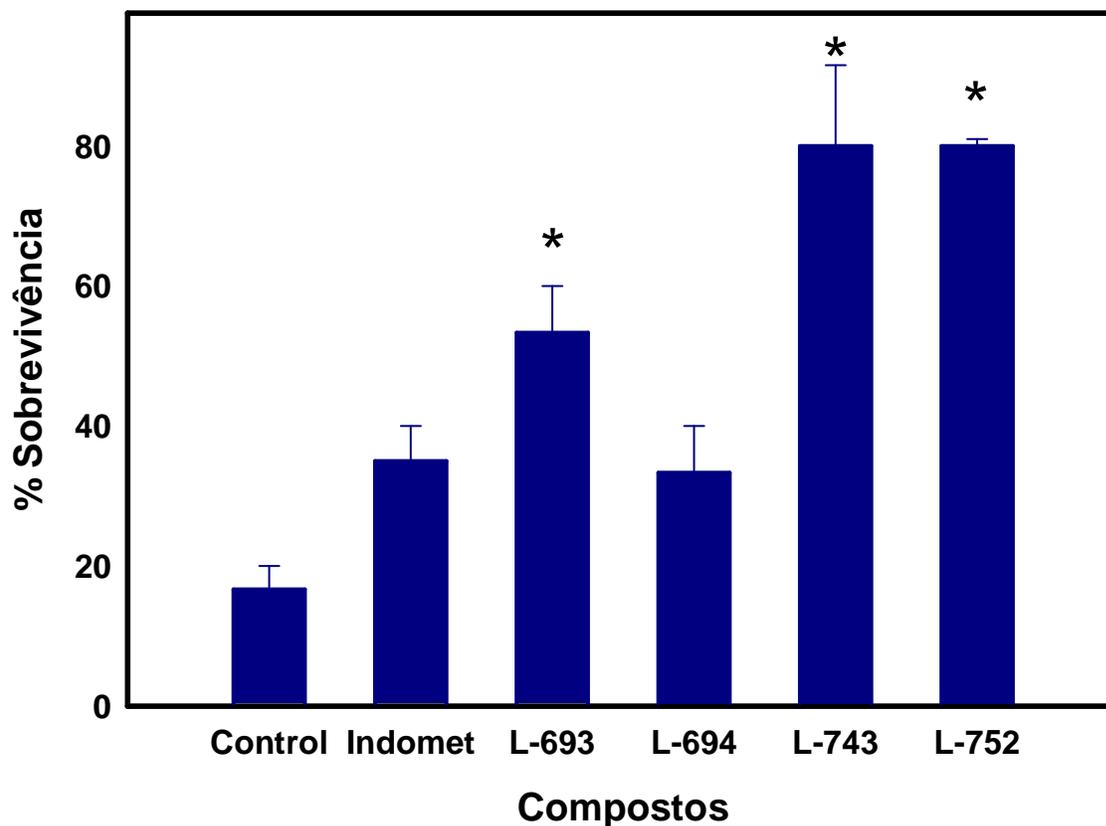
## 4.6.2 Indução por trombina

Quando induzimos a tromboembolia pulmonar com trombina, além da capacidade desta em ativar as plaquetas, existem suas outras funções que incluem a ativação de outros fatores da coagulação, que serão avaliadas. Desta forma, neste ensaio a ação dos compostos sobre a trombina e/ou sobre os seus receptores seria mais bem avaliada que no ensaio anterior.

Continuando, então, a caracterização *in vivo* desses compostos, induzimos a tromboembolia pulmonar com trombina humana (2000 UI/Kg). Nesse modelo foram usados três grupos com cinco camundongos cada um, para cada composto testado, inclusive para o ensaio controle e para o composto usado como controle positivo.

Assim, como no ensaio anterior os compostos e a indometacina foram administrados, por via oral, na concentração de 100  $\mu\text{mol/kg}$ , uma hora antes da indução da tromboembolia, pela administração intravenosa de trombina humana.

Na Figura 24 podemos observar os resultados obtidos no ensaio de tromboembolia induzida por trombina. Sendo que, novamente os compostos LASSBio 693, LASSBio 743 e LASSBio 752 foram os mais potentes, aumentando significativamente a sobrevivência dos animais testados. Desta forma, verificamos uma proteção, na mortalidade, de  $50 \pm 5$ ,  $80 \pm 6$  e  $80 \pm 1\%$  com os compostos LASSBio 693, LASSBio 743 e LASSBio 752 respectivamente, em relação a  $20 \pm 2\%$  de sobrevivência obtida para o grupo controle.



**Figura 24: Efeito dos compostos sobre a Tromboembolia pulmonar induzida por trombina**

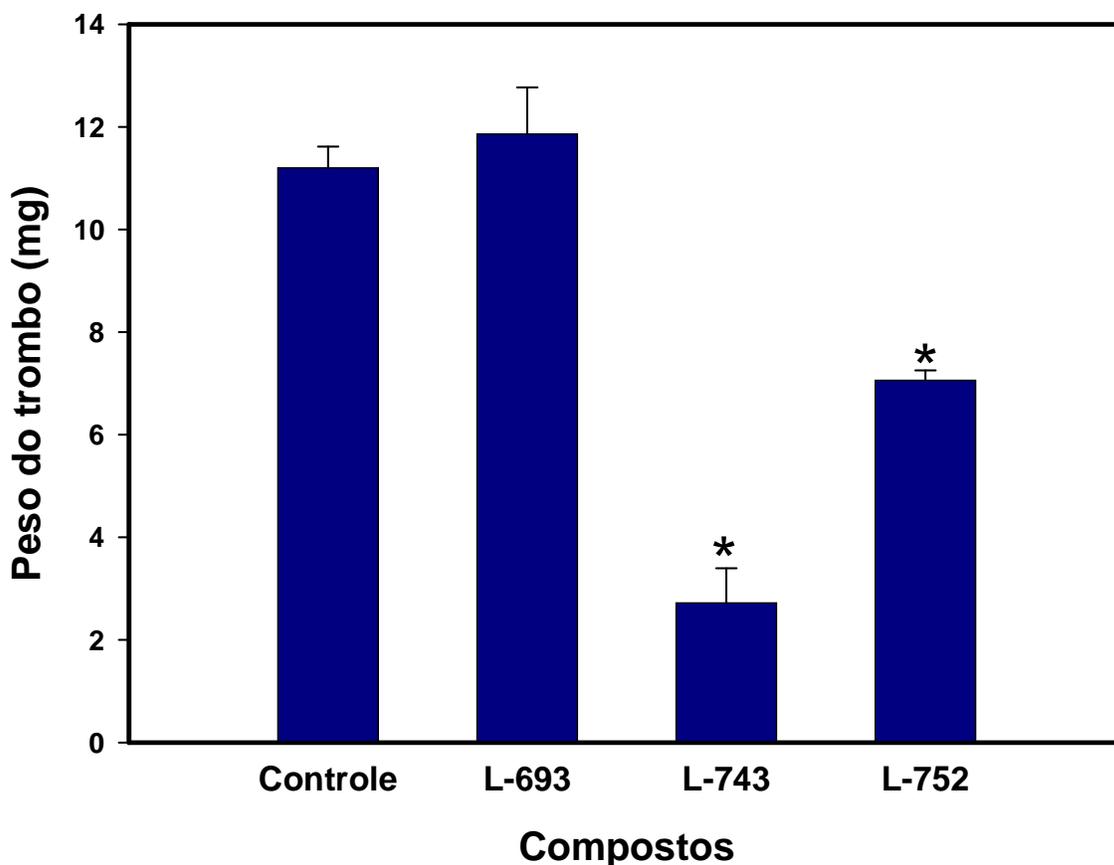
Os compostos LASSBio 693, LASSBio 694 e LASSBio 743 (100 µmol/kg) foram administrados oralmente 1 hora antes da indução da trombose por injeção i.v. com trombina humana (2000 UI/Kg). Indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos. Cada ponto é uma média ± SD de 3 grupos com 5 animais cada um.\* p < 0,05

O composto LASSBio 694 se mostrou o menos potente apresentando 35 ± 11 % de sobrevivência dos animais tratados em relação ao grupo não tratado.

De uma forma geral, os compostos testados apresentaram certo grau de proteção contra a mortalidade induzida nestes ensaios, podendo vir a serem úteis no tratamento de sintomas de doenças cardiovasculares.

## **4.7 Trombose venosa profunda**

Avaliando os resultados obtidos nos modelos de tromboembolia pulmonar, escolhemos os compostos LASSBio 693, LASSBio 743 e LASSBio 752 para continuara a avaliação do potencial antitrombótico dos derivados acilhidrazônicos. Neste modelo avaliamos a formação de trombo sob dois aspectos principais: o estado de hipercoagulabilidade, proporcionado pela administração de tromboplastina cálcica (3 mg/mL) que inicia a formação de trombos e a estase sanguínea que facilita o encontro dos fatores de coagulação, também aumentando a probabilidade de formação de trombos. A Figura 25 mostra os resultados obtidos pra estes compostos. Neste modelo o composto LASSBio 693 não foi efetivo, não sendo capaz de diminuir a formação de trombo, já o composto LASSBio743 foi o mais potente, diminuindo significativamente o tamanho do trombo, diminuição esta de  $75,7 \pm 0,7$  % e o LASSBio 752 também foi capaz de diminuir o trombo em  $37 \pm 0,2$  % comparado ao trombo controle.



**Figura 25:** Efeito dos derivados acilhidrazônicos sobre a trombose venosa profunda.

As doses 100  $\mu\text{mol/kg}$  dos compostos foram administradas oralmente 60 minutos antes da indução de trombose por tromboplastina (3 mg/kg de peso corporal) combinado com estase, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média  $\pm$  SD de 5 animais. \*  $p < 0,05$

## 4.8 Avaliação dos compostos no modelo de hemorragia induzido (HI)

Os ensaios de risco hemorrágico em modelos animais são fundamentais, pois a hemorragia é um efeito colateral que se destaca nas terapias

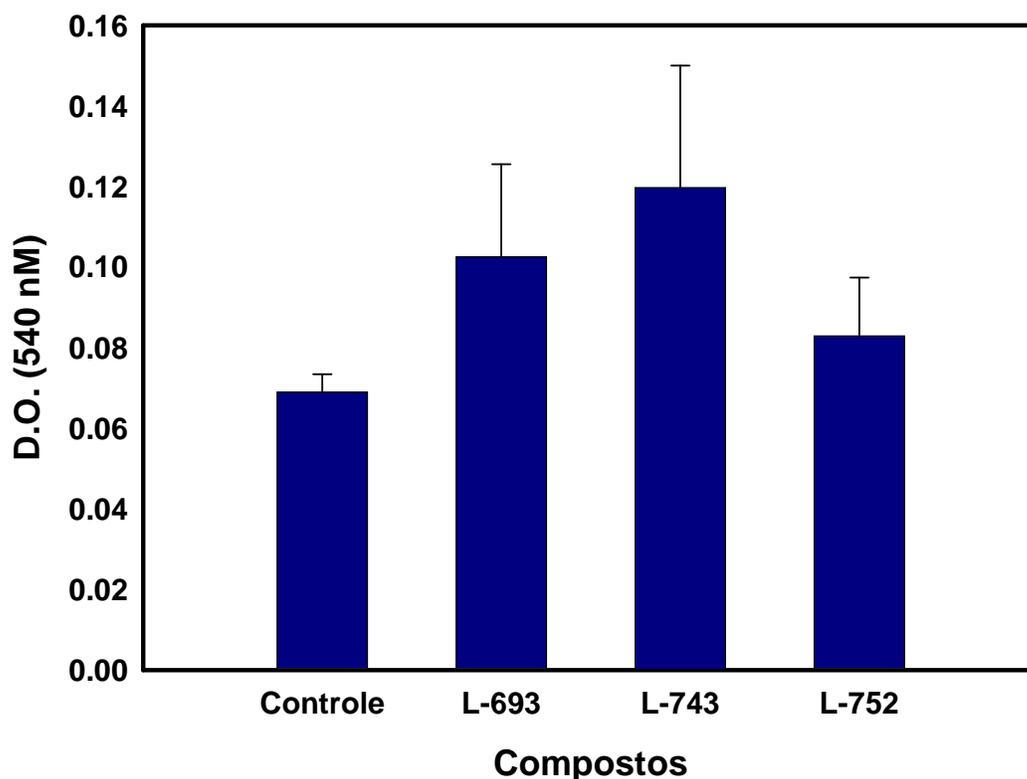
antitrombóticas e trombolíticas. A análise em nosso trabalho do efeito hemorrágico dos derivados acilhidrazônicos foi baseado na perda de sangue pela cauda do rato.

Através deste experimento, foi observado que o efeito hemorrágico não foi importante para nenhum dos compostos testados (Figura 26), conferindo aproximadamente 1,5 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,106 \pm 0,05$ ) para o composto LASSBio 693, 1,7 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,12 \pm 0,03$ ) para o composto LASSBio 743 e 1,2 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,08 \pm 0,01$ ) para o composto LASSBio 752, quando comparado aos valores do grupo controle (D.O.  $0,07 \pm 0,001$ ), indicando que o efeito observado, não é significativo ( $n = 8$ ). Outras moléculas com atividade antitrombótica apresentam elevado sangramento pós administração, como a glicirrizina e fármacos usados na clínica como a heparina que aumentam o sangramento em aproximadamente 5 vezes nas doses de 90 mg/ kg e 5,0 mg/kg, respectivamente (MENDES-SILVA e col., 2003; ZANCAN e MOURÃO, 2004)

## **4.9 Avaliação do composto LASSBio752 no modelo de trombose venosa profunda**

A partir dos resultados obtidos no modelo de trombose venosa profunda e nos resultados obtidos *in vitro* para agregação plaquetária resolvemos avaliar mais profundamente a atividade antitrombótica do composto LASSBio 752. A Figura 27

mostra os resultados obtidos neste modelo, os animais foram tratados oralmente com concentrações distintas do composto.



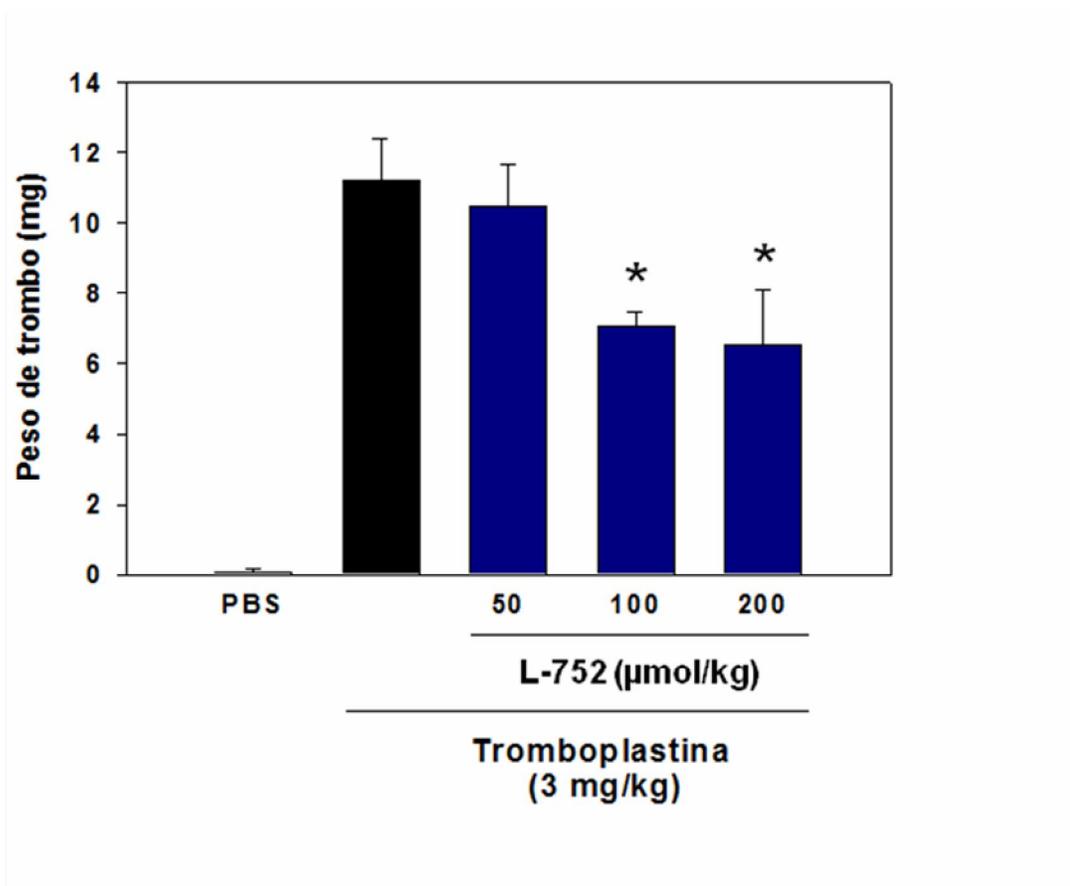
**Figura 26: Determinação do risco hemorrágico.**

Os animais foram tratados, por via oral, 60 minutos antes do corte transversal a 3 mm da parte distal do rabo do rato. A perda de sangue foi avaliada 0 a 60 minutos após, pela medida da quantidade de hemoglobina presente na solução dos grupos tratados e não tratados através de leitura ótica a 540 nm, como descrito em material e métodos. Cada barra representa a média  $\pm$  SD (n = 8) de 5 animais. \* p < 0,05.

Podemos observar que a concentração de 50  $\mu$ mol/Kg não foi capaz de inibir significativamente a formação de trombo, e a concentração de 200  $\mu$ mol/kg

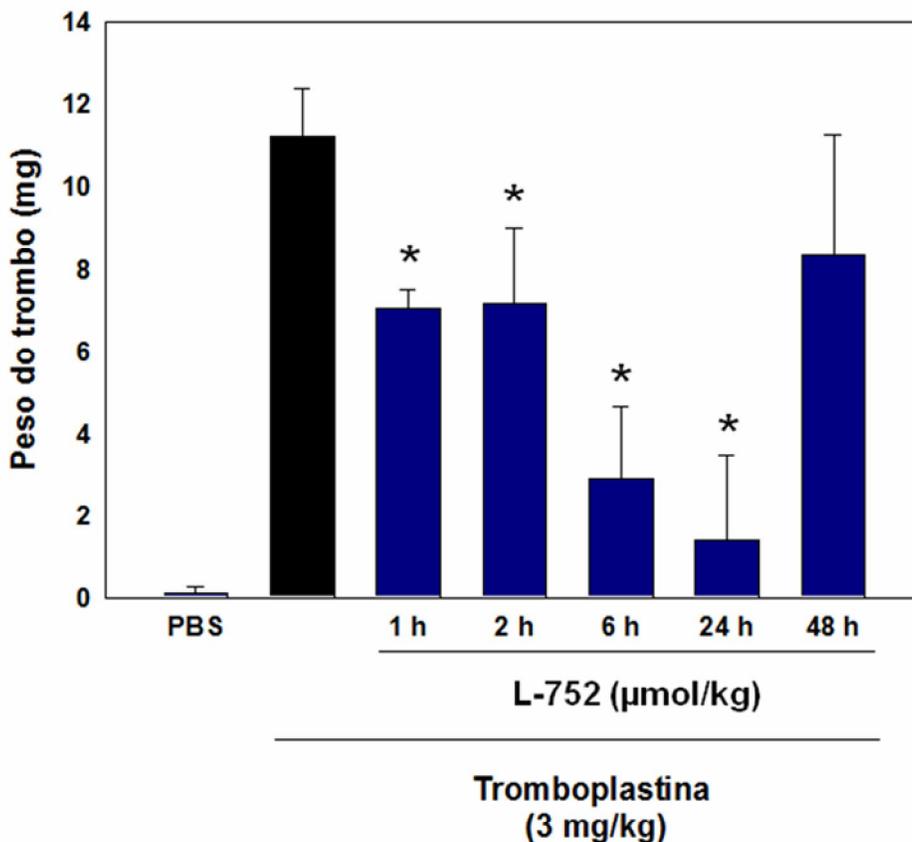
não apresentou um efeito maior que a concentração de 100  $\mu\text{mol/kg}$  também mostrada na Figura 25.

Resolvemos a partir dos dados da figura 27 continuar trabalhando com a concentração de 100  $\mu\text{mol/kg}$  e avaliar a atividade antitrombótica relacionada ao intervalo de tempo entre a administração, por via oral, e a indução da trombose, resultados estes mostrados na figura 28.



**Figura 27: Efeito LASSBio 752 sobre a trombose venosa profunda.**

As doses de 50, 100, 200  $\mu\text{mol/kg}$  do composto foram administradas oralmente 60 minutos antes da indução de trombose por tromboplastina (3 mg/kg de peso corporal) combinado com estase, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média  $\pm$  SD de 5 animais. \*  $p < 0,05$



**Figura 28: Curso temporal do efeito do LASSBio 752 sobre a trombose venosa profunda.**

A dose de 100 µmol/kg do composto foi administrada oralmente 1, 2, 6, 24 e 48 horas antes da indução de trombose por tromboplastina (3 mg/kg de peso corporal) combinado com estase, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média ± SD de 5 animais. \* p < 0,05

Os resultados da figura 28 nos mostram que a atividade antitrombótica do LASSBio 752 apresentou melhor resultado 24 horas após a administração oral, diminuindo em 87,5 ± 2,1 % o tamanho do trombo. Este efeito é perdido em 48 horas, quando a redução do trombo é de apenas 38,8 ± 0,9 %.

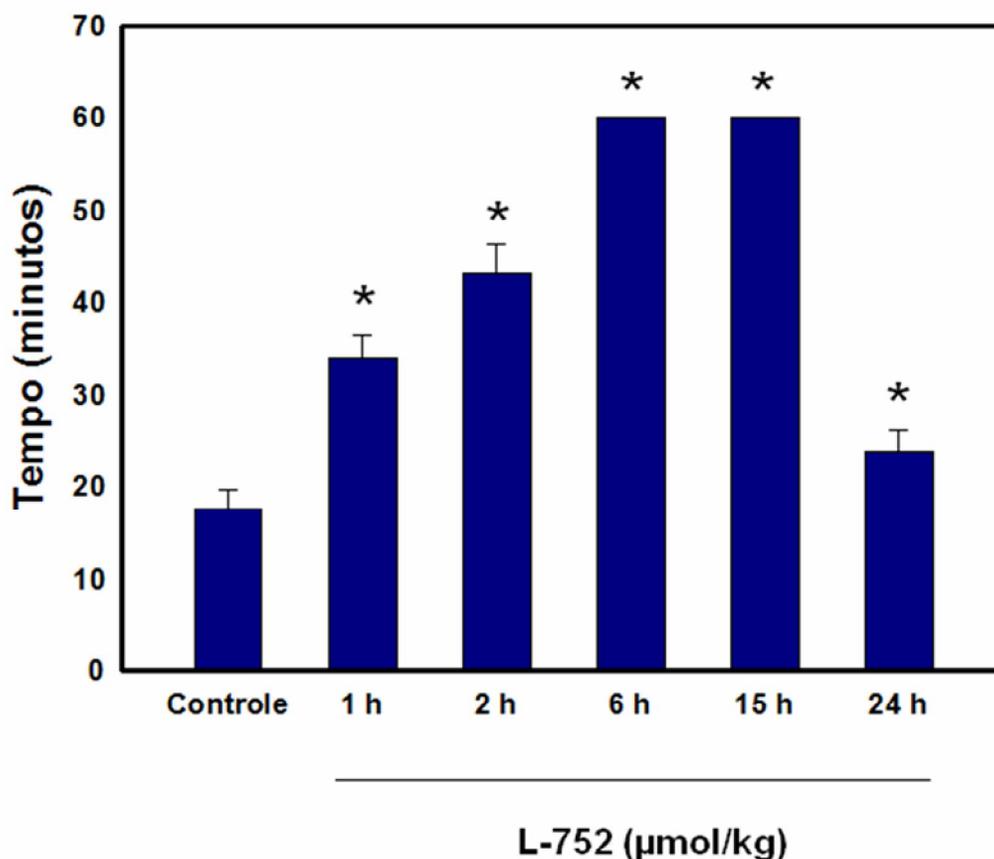
Experimentos no modelo de trombose venosa profunda, com administração do composto por via intravenosa, cinco minutos antes da indução da trombose, nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{mol/kg}$  foram realizados, porém sem mostrar nenhuma atividade.

## **4.10 Avaliação do composto LASSBio 752 no modelo de trombose arterial**

Uma vez que, o composto LASSBio 752 apresentou um perfil inibitório significativo, quando avaliado no ensaio de agregação plaquetária, resolvemos dar continuidade a avaliação da atividade antitrombótica deste composto, realizando o modelo de trombose arterial.

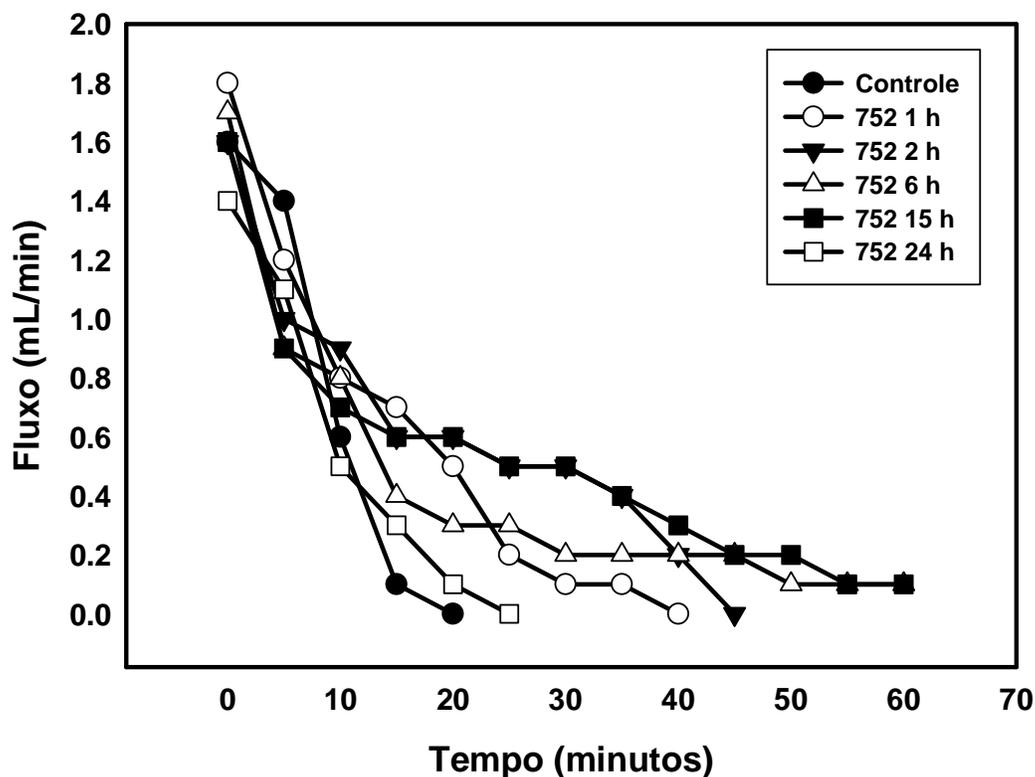
Assim como na Figura 28, avaliamos a atividade antitrombótica relacionada ao intervalo de tempo entre a administração, por via oral, e a indução da trombose arterial. Os resultados são mostrados na Figura 29, e podemos observar que a ação antitrombótica do LASSBio 752 no modelo de trombose arterial também é tempo dependente. Após 1 hora da administração oral já há um prolongamento no tempo de oclusão total, que foi de  $34 \pm 2,4$  minutos, e entre os intervalos de 6 e 15 horas de administração não houve oclusão da artéria até o tempo de 60 minutos (tempo máximo avaliado). A oclusão começa a ser observada em 24 horas após a administração, onde o tempo de oclusão é de  $23,8 \pm 2,3$  minutos, próximo ao tempo controle ( $17,6 \pm 2,0$  minutos).

A Figura 30 mostra a medida do fluxo sanguíneo dos animais no modelo de trombose arterial, onde cada linha representa um animal de cada grupo testado (intervalo de administração). A partir da indução da trombose observamos o decaimento do fluxo arterial, marcado a cada cinco minutos, até a oclusão total da artéria ou até o tempo máximo de 60 minutos, tempo total do experimento.



**Figura 29: Efeito tempo dependente do LASSBio 752 sobre a trombose arterial.**

A dose de 100 µmol/kg do composto foi administrada oralmente 1, 2, 6 e 24 horas antes da indução de trombose pelo laser combinado com administração do corante Rosa de Bengala, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média ± SD de 5 animais. \* p < 0,05



**Figura 30:** Medida do fluxo sanguíneo após administração do LASSBio 752 no modelo de trombose arterial.

Cada linha representa um animal de cada grupo (intervalo de tempo), mostrando a diminuição do fluxo sanguíneo e também o tempo total de oclusão arterial. Os animais receberam por via oral 100  $\mu\text{mol/kg}$  de LASSBio 752, nos intervalos citados na legenda, antes da indução da trombose.

#### 4.11 Avaliação do composto LASSBio 752 no modelo de hemorragia induzida (HI)

Assim como realizado na Figura 26, avaliamos o risco hemorrágico do composto LASSbio 752. A análise foi realizada sobre o curso temporal variando-se

os tempos entre a administração do composto e a medida da perda de sangue pela cauda do animal (1, 2, 6, 15, 24 e 48 horas).

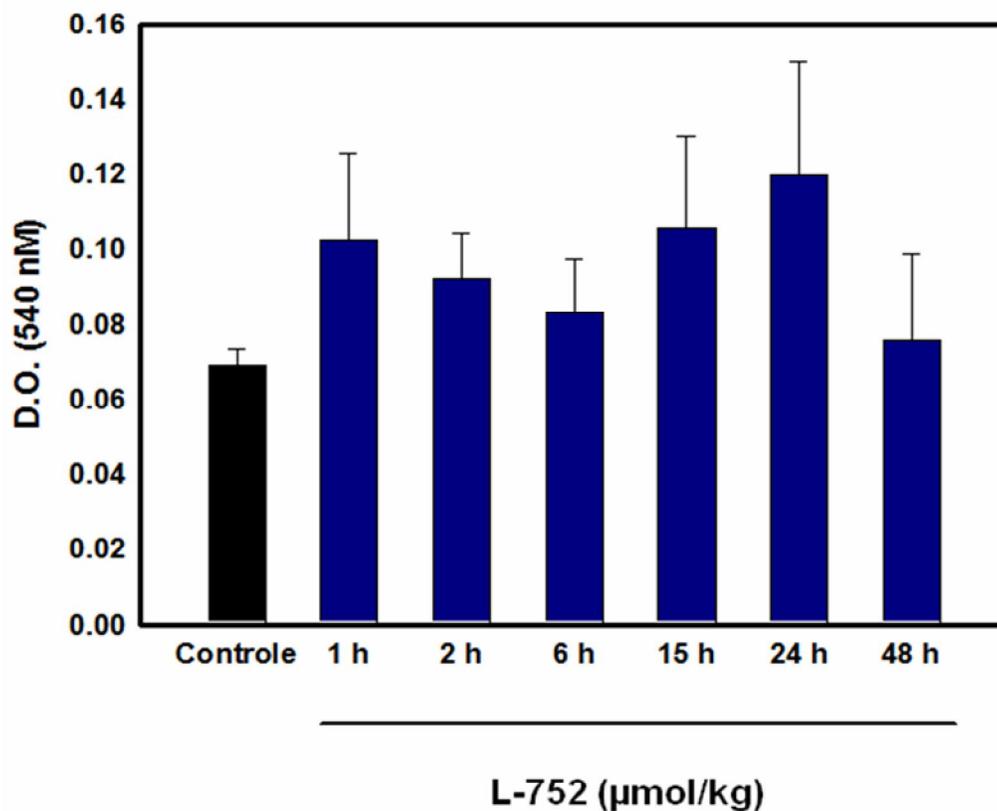
Através deste experimento, foi observado que o efeito hemorrágico não foi muito intenso para nenhum dos intervalos testados (Figura 31), conferindo aproximadamente 1,16 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,106 \pm 0,02$ ) para o intervalo de 1 hora, 1,3 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,092 \pm 0,01$ ) para o intervalo de 2 horas e 1,2 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,083 \pm 0,01$ ) para o intervalo de 6 horas, 1,5 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,106 \pm 0,02$ ) para o intervalo de 15 horas, 1,7 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,12 \pm 0,03$ ) para o intervalo de 24 horas e 1,1 vezes um aumento de sangramento (D.O.  $0,08 \pm 0,02$ ) para o intervalo de 48 horas, quando comparado aos valores do grupo controle (D.O.  $0,069 \pm 0,01$ ), indicando que o efeito observado, não é significativo ( $n = 8$ ) e que tende a diminuir de acordo com o tempo, de forma bem parecida com os modelos de trombose testados.

## **4.12 Ensaios de aPTT e PT *ex vivo***

Na tentativa de avaliar o perfil do composto LASSBio 752 nos ensaios de coagulação, administramos o composto para os animais, por via oral, em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 6, 15 e 24 horas) antes da coleta sanguínea.

A tabela 6 mostra os resultados obtidos nestes ensaios. Podemos observar que o composto LASSBio 752 prolongou o tempo de coagulação no ensaio de tempo de protrombina (PT) em 37,7 % no intervalo de 1 hora e no

ensaio de Tempo parcial de tromboplastina ativada (aPTT) em 41,2 %, 22,6 %, 49,9 % nos intervalos de 1, 2 e 15 horas, respectivamente.



**Figura 31:** Determinação do risco hemorrágico do composto LASSBio 752.

Os animais foram tratados, por via oral, em diferentes intervalos de tempo antes do corte transversal a 3 mm da parte distal do rabo do rato. A perda de sangue foi avaliada de 0 a 60 minutos após o corte, pela medida da quantidade de hemoglobina presente na solução dos grupos tratados e não tratados através de leitura ótica a 540 nm, como descrito em material e métodos. Cada barra representa a média  $\pm$  SD (n = 8).

Estes resultados sugerem que este composto apresenta atividade anticoagulante moderada quando administrado *ex vivo*, mostrando um perfil diferente do que o apresentado no ensaio *in vitro*, onde não apresentou nenhuma atividade.

**aPTT e PT *ex vivo* do composto  
LASSBio 752 (100 µmol/kg)**

	<i>PT</i>	<i>aPTT</i>
<b>Controle</b>	<b>25,8 ± 1,7</b>	<b>30,1 ± 1,9</b>
<b>1 h</b>	<b>26,8 ± 5,8</b>	<b>42,5 ± 2,8 *</b>
<b>2 h</b>	<b>25,6 ± 1,8</b>	<b>36,9 ± 3,9 *</b>
<b>6 h</b>	<b>36,6 ± 5,9 *</b>	<b>32,3 ± 4,7</b>
<b>15 h</b>	<b>30,1 ± 4,9</b>	<b>45,1 ± 12,0 *</b>
<b>24 h</b>	<b>22,6 ± 1,7</b>	<b>27,1 ± 1,8</b>

**Tabela 6:** Os compostos foram administrados nos intervalos de tempo determinados (1, 2, 6, 15 e 24 horas) antes das coletas sanguíneas. \* p < 0,05

## 4.13 Agregação plaquetária em plaquetas humanas

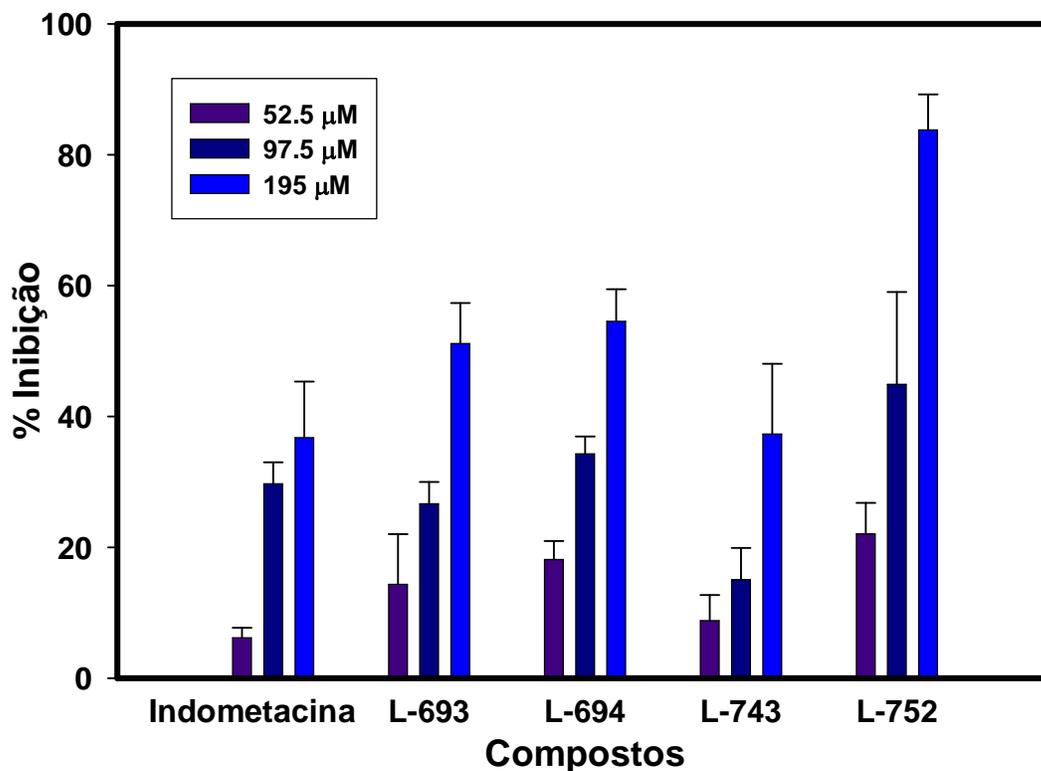
### 4.13.1 Indução por trombina

Os resultados obtidos até o momento indicam atividade dos compostos sobre plaqueta de ratos e no modelos *in vivo* utilizando ratos e camundongos. A fim de avaliar se os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e

LASSBio 752 apresentariam atividades semelhantes sobre plaquetas humanas, e também a fim de aprofundar o conhecimento do mecanismo de ação destas substâncias realizamos diferentes ensaios utilizando plaquetas humanas. A figura 32 mostra os resultados obtidos nos ensaios de agregação plaquetária usando trombina (10 nM) como agonista. Obtivemos  $57 \pm 6$  % de inibição na presença de LASSBio 693 (195  $\mu$ M),  $53,2 \pm 8$  % na presença de LASSBio 694 (195  $\mu$ M),  $37,3 \pm 4$  % na presença de LASSBio 743 (195  $\mu$ M),  $83,8 \pm 9$  % na presença de LASSBio 752 (195  $\mu$ M).

#### **4.13.2 Indução por colágeno e ADP**

Apesar de buscarmos compostos específicos para trombina, precisávamos testar também outros agonistas para observarmos e compararmos o comportamento dos compostos nos diferentes tipos de plaquetas. Realizamos então os ensaios de agregação plaquetária induzidos por outros dois agonistas: colágeno (1,6  $\mu$ g/mL) e ADP (5  $\mu$ M), com o objetivo de verificarmos se os compostos poderiam estar interferindo na agregação plaquetária por outros mecanismos, diferentes da trombina.



**Figura 32:** Efeitos dos compostos acilhidrazônicos sobre a agregação plaquetária induzida por trombina (10 nM) em plaquetas humanas

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. A indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados.

A Figura 33 mostra os resultados obtidos na agregação plaquetária induzida por colágeno. Obtivemos em torno de  $90 \pm 7$  % de inibição na presença de LASSBio 693 (195  $\mu$ M), 100 % de inibição na presença de LASSBio 694

(195  $\mu$ M),  $1,7 \pm 1$  % de inibição na presença de LASSBio 743 (195  $\mu$ M) e  $5 \pm 2$  % de inibição na presença de LASSBio 752 (195  $\mu$ M).

A Figura 34 mostra os resultados obtidos na agregação plaquetária induzida por ADP. Obtivemos em torno de  $60 \pm 5$  % de inibição na presença de LASSBio 693 (195  $\mu$ M),  $53 \pm 2$  % de inibição na presença de LASSBio 694 (195  $\mu$ M),  $17 \pm 5$  % de inibição na presença de LASSBio 743 (195  $\mu$ M) e  $25 \pm 8$  % de inibição na presença de LASSBio 752 (195  $\mu$ M).

Os dados obtidos apontam para uma inibição mista do composto LASSBio 693 e mais específica para a trombina dos inibidores LASSBio 743 e LASSBio 752.

A tabela 7 mostra os valores de  $IC_{50}$  calculados para a Indometacina e os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752, para os indutores trombina, colágeno e ADP.

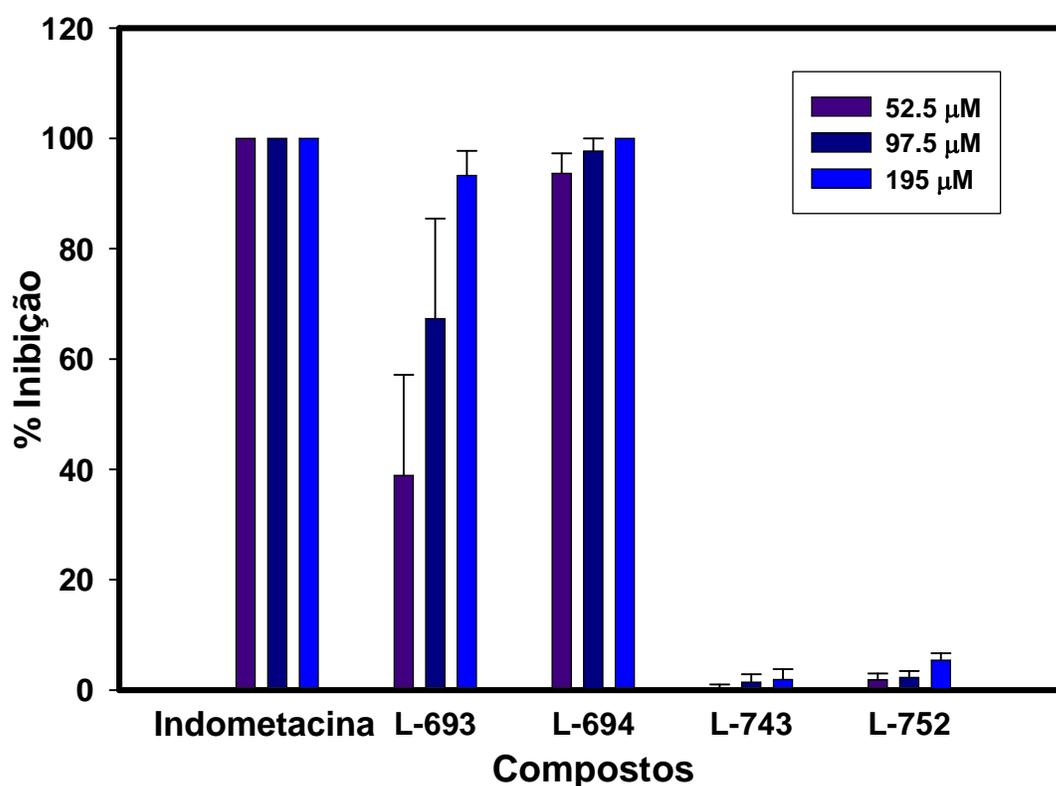
### **4.13.3 Indução por TRAP-1 e TRAP-4A**

Como obtivemos resultados positivos com alguns compostos em relação à trombina, tentamos avaliar se esses compostos estariam se ligando diretamente à trombina ou aos seus receptores plaquetários, ou ainda interferindo na resposta celular direta ao estímulo desses receptores.

As plaquetas humanas também apresentam o receptor PAR-1 que não está presente em plaquetas de ratos e camundongos (SOSLAU e col., 2001) então, nós utilizamos dois agonistas sintéticos dos receptores PAR-1 e PAR-4: TRAP-1

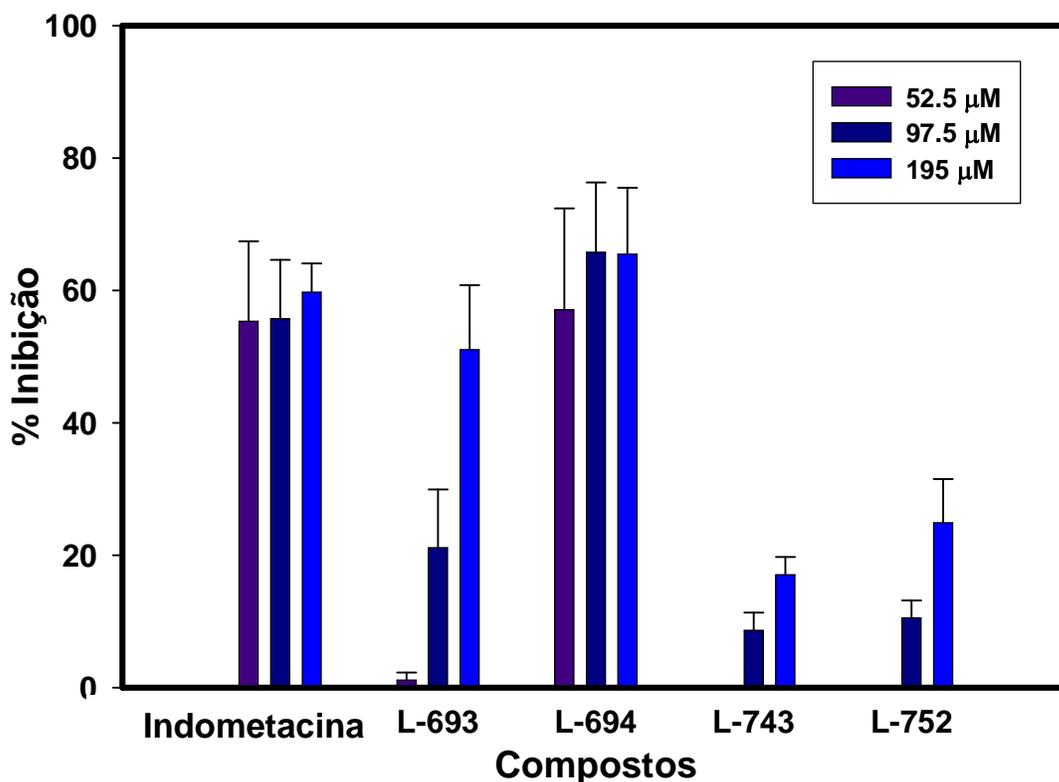
(SFLLRNP) e TRAP-4A (AYPGKF), respectivamente (SOSLAU e col., 2001).

A Figura 35 mostra os resultados obtidos nos ensaios de agregação plaquetária usando TRAP-1 (16,4  $\mu\text{M}$ ) como agonista. Obtivemos então 52 % de inibição na presença de LASSBio 693 (195  $\mu\text{M}$ ), 44,5  $\pm$  6 % de inibição na presença de LASSBio 694 (195  $\mu\text{M}$ ), 6  $\pm$  2 % de inibição na presença de LASSBio 743 (195  $\mu\text{M}$ ) e 72,7  $\pm$  8% de inibição na presença de LASSBio 752 (195  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 33:** Efeitos dos compostos acilhidrazônicos sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno (1,6  $\mu\text{g/mL}$ ) em plaquetas humanas

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. Indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados.



**Figura 34: Efeitos dos compostos acilhidrazônicos sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (5 μM) em plaquetas humanas**

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. Indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados.

A Figura 36 mostra os resultados obtidos nos ensaios de agregação plaquetária usando o TRAP-4A (0,25 mM) como agonista. Obtivemos  $85,2 \pm 6$  % de inibição na presença de LASSBio 693 (195 μM),  $44,5 \pm 2$  % de inibição na presença de LASSBio 694 (195 μM),  $2,5 \pm 1$  % de inibição na presença de LASSBio 743 (195 μM) e  $35,9 \pm 3$  % de inibição na presença de LASSBio 752 (195 μM).

## Valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de agregação plaquetária (humanas)

<b>Compostos</b>	<b>trombina</b>	<b>colágeno</b>	<b>ADP</b>
Indometacina	> 195 µM	<52.5 µM	<52.5 µM
LASSBio 693	191 µM	70 µM	191 µM
LASSBio 694	172.5 µM	<52.5 µM	<52.5 µM
LASSBio 743	> 195 µM	> 195 µM	> 195 µM
LASSBio 752	109.2 µM	> 195 µM	> 195 µM

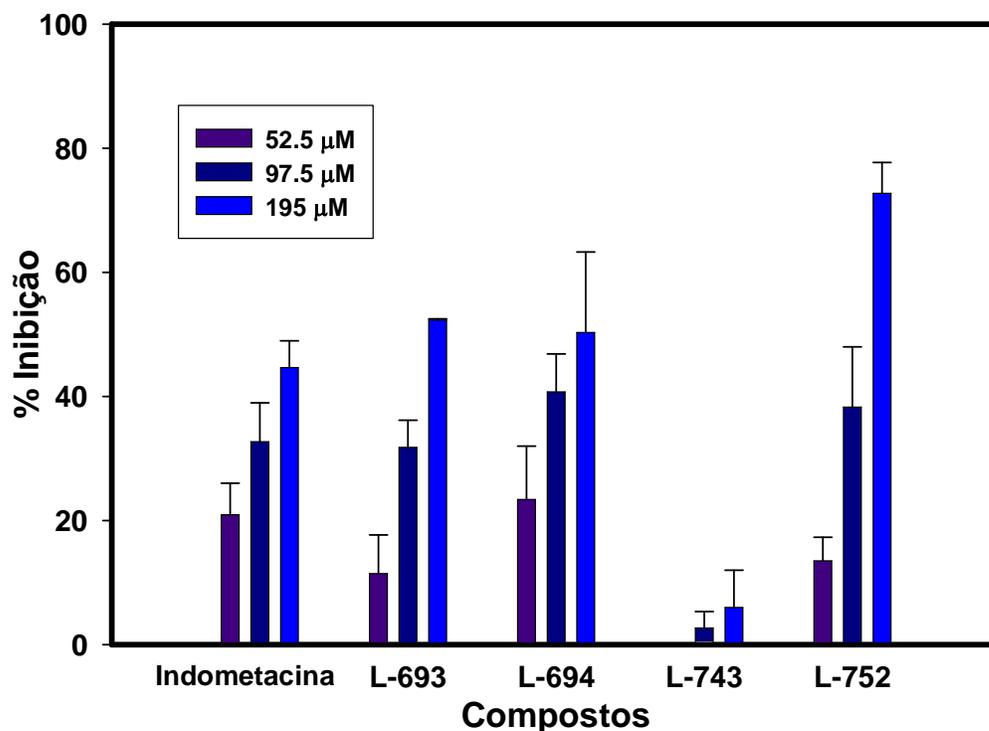
**Tabela 7:** A tabela os valores de IC<sub>50</sub> calculados para indometacina e para os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752. Os valores referem-se aos ensaios apresentados nas Figuras 32, 33 e 34.

A tabela 8 mostra os valores de IC<sub>50</sub> calculados para a Indometacina e os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752, para os indutores TRAP-1 e TRAP-4A.

A Figura 37 mostra uma visão geral do perfil antiplaquetário dos compostos acilhidrazônicos. Nela estão mostradas as porcentagens de inibição de todos os compostos, inclusive a indometacina (usada como controle positivo), nas maiores concentrações usadas e com todos os agonistas testados, a fim de proporcionar uma melhor visualização e comparação dos resultados obtidos com os ensaios de agregação plaquetária.

Assim, podemos observar que o composto LASSBio 752 é o que apresenta maior inibição da trombina e de PAR-1, enquanto que o LASSBio 693 apesar de inibir preferencialmente PAR-4, inibe também efetivamente o colágeno,

já o LASSBio 694 inibe bem a agregação induzida por colágeno e parcialmente dos outros indutores; interessante o LASSBio 743 inibe trombina parcialmente e não inibe nenhum dos outros indutores.

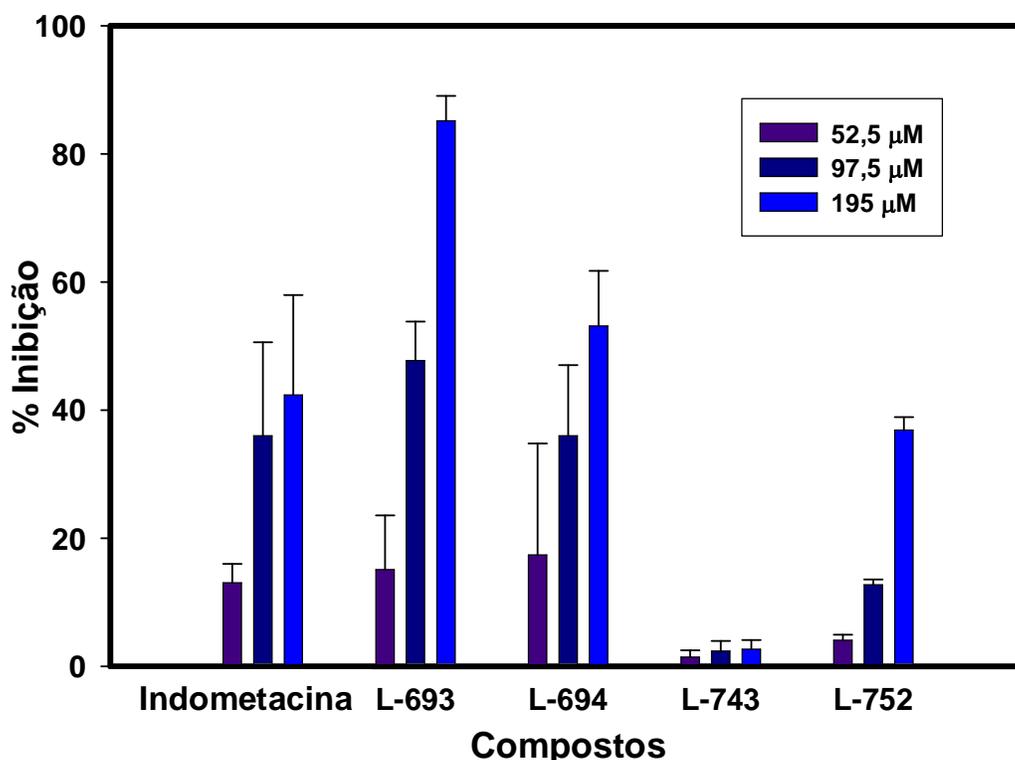


**Figura 35:** Efeitos dos compostos acilhidrazônicos sobre a agregação plaquetária induzida por TRAP-1 (SFLLRNP) (16,4 μM) em plaquetas humanas

Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. A indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados.

## 4.14 Tempo de recalcificação em plasma humano

Além da atividade destes compostos nos ensaios de agregação plaquetária e suas ações diretas na trombina, resolvemos avaliar uma possível atividade sobre outros fatores da coagulação. Para isto, avaliamos o tempo de recalcificação usando plasma humano, pobre em plaquetas (PPP).



**Figura 36:** Efeitos dos compostos acilhidrazônicos sobre a agregação plaquetária induzida por TRAP-4A (AYPGKF) (0,25 mM) em plaquetas humanas

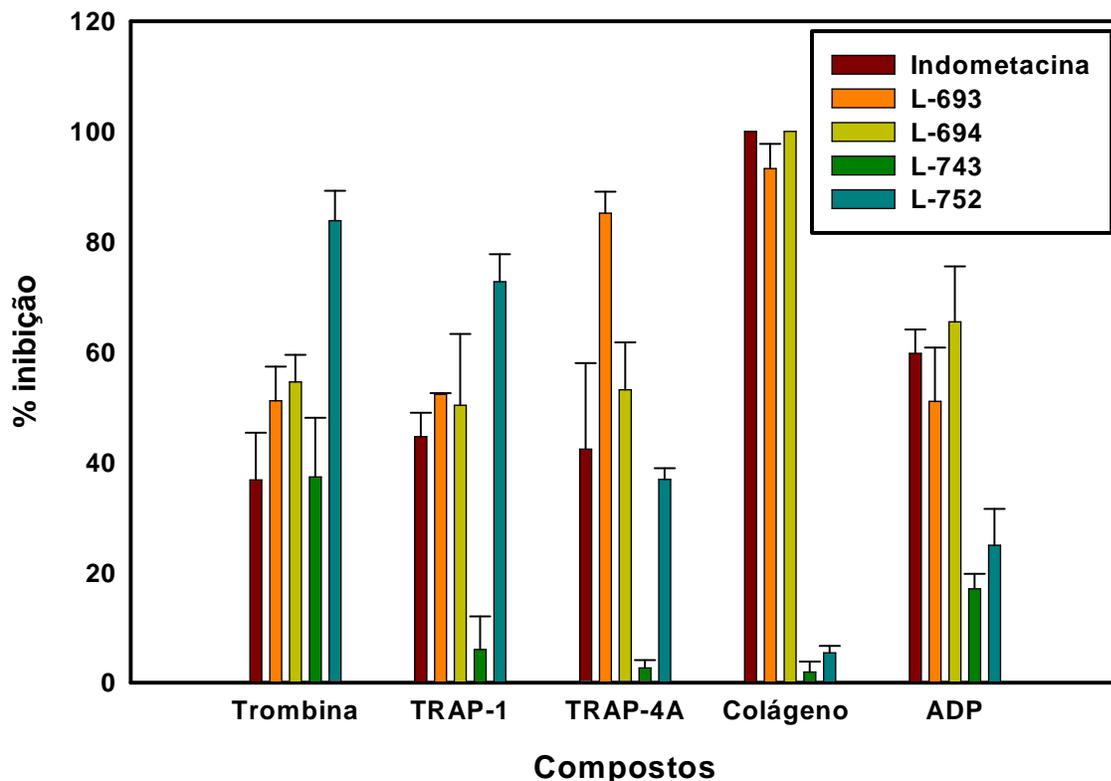
Avaliação dos compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 como inibidores da agregação. A indometacina foi usada como controle positivo na mesma concentração dos compostos testados.

## Valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de agregação plaquetária (humanas)

<b>Compostos</b>	<b>TRAP-1</b>	<b>TRAP-4A</b>	<b>trombina</b>
Indometacina	>195 µM	>195 µM	> 195 µM
LASSBio 693	184 µM	103 µM	191 µM
LASSBio 694	192.5 µM	178 µM	172.5 µM
LASSBio 743	>195 µM	>195 µM	>195 µM
LASSBio 752	131 µM	>195 µM	109.2 µM

**Tabela 8:** A tabela apresenta os valores de IC<sub>50</sub> calculados para a indometacina e para os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752. Os valores referem-se aos ensaios apresentados nas figuras 35 e 36.

Os resultados mostrados na Figura 22 mostram a ação dos compostos no plasma pobre em plaquetas (PPP). Como podemos observar o composto LASSBio 694 prolongou o tempo de coagulação do plasma em apenas  $30 \pm 6,1$  %. No entanto, o composto LASSBio 752 também prolongou o tempo de coagulação em cerca de  $23 \pm 0,5$  %. Apesar do aumento estatisticamente significativo, do ponto de vista farmacológico nenhum dos compostos pode ser considerado anticoagulante, já que normalmente este tipo de droga leva a um prolongamento mais intenso do tempo de coagulação em pelo menos 2,5 vezes.



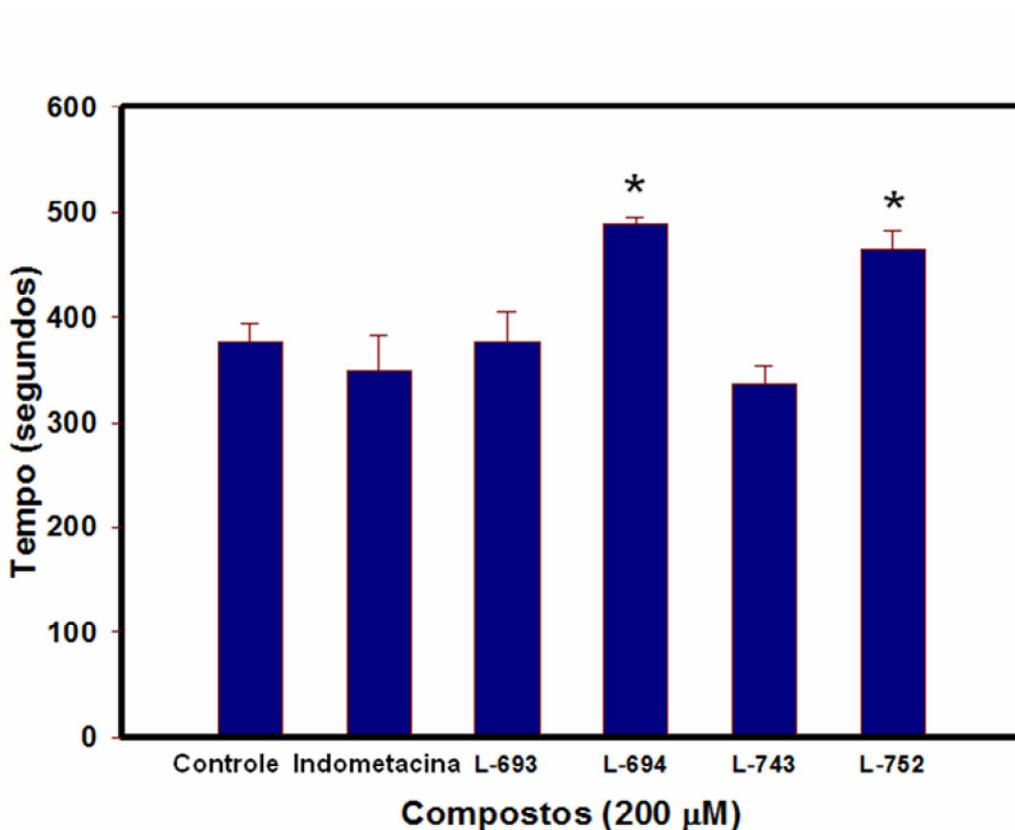
**Figura 37: Resumo das agregações plaquetária em plaquetas humanas**

Agregação plaquetária induzida por trombina (10  $\mu$ M), colágeno (1,6  $\mu$ g/mL), ADP (5  $\mu$ M), TRAP-1 (SFLLRNP) (16,4  $\mu$ M) e TRAP-4A (AYPGKF) (0,25 mM), usando os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752 e Indometacina, todos na concentração de 195  $\mu$ M, como inibidores da agregação.

#### 4.15 Mensuração de cálcio citoplasmático

O aumento da concentração de cálcio intracelular é de grande importância para os processos de adesão e agregação plaquetária e está diretamente

relacionado aos receptores plaquetários, incluindo os receptores de trombina PAR-1 e PAR-4. Com o intuito de avaliarmos uma possível atuação dos derivados acilhidrazônicos em mecanismos de sinalização intracelulares plaquetários, quantificamos a variação da concentração deste íon na presença dos compostos frente aos indutores plaquetários: Trombina, TRAP-1 e TRAP4A.



**Figura 38:** Tempo de recalcificação realizado com plasma humano pobre em plaquetas (PPP).

Todos os compostos foram usados próximos à concentração máxima usada no ensaio de agregação plaquetária. No grupo controle foi adicionado o mesmo volume de TBS no lugar dos compostos. \*  $p < 0,05$

Os dados da indução por trombina são mostrados na tabela 9. Podemos observar que praticamente todos os compostos são capazes de inibir, em diferentes intensidades, o influxo de cálcio, inclusive a Indometacina, e que esta inibição é de forma concentração dependente. O composto LASSBio 693 seguido pelo LASSBio 743 (200  $\mu$ M) foram os que apresentam maior potência, inibindo  $89,6 \pm 4,0$  % e  $77,3 \pm 5,0$  %, respectivamente, a mobilização do cálcio intracelular.

Os resultados da indução pelo TRAP-1 estão mostrados na Tabela 10. O perfil de inibição para este agonista foi diferente do que o observado para trombina (Tabela 9). Novamente, todos os compostos inclusive a Indometacina, foram capazes de inibir, em diferentes intensidades, o influxo de cálcio. O composto LASSBio 693 foi o mais potente, inibindo  $71,9 \pm 8,6$  % a mobilização do cálcio intracelular, seguido pelo composto LASSBio 752 inibindo  $71,7 \pm 4,3$  % e pelo composto LASSBio 743 inibindo  $61,2 \pm 5,8$  %. O composto LASSBio 694 foi o menos potente inibindo somente  $44,8 \pm 5,3$  %. na concentração de 200  $\mu$ M.

A Tabela 11 mostra os resultados da indução por TRAP-4A. Novamente o composto que mais se destacou foi o LASSBio 693 inibindo  $82,8 \pm 3,7$  % a mobilização do cálcio intracelular, seguido pelo composto LASSBio 743 inibindo  $77,0 \pm 5,2$  %. Os compostos LASSBio 694 e LASSBio 752 foram os menos ativos inibindo somente  $42,9 \pm 7,7$  % e  $54,1 \pm 5,5$  % a mobilização do cálcio intracelular, para concentração de 200  $\mu$ M.

## 4.16 Interações com o receptor PAR-1

Na tentativa de avaliar uma possível interação entre os compostos e o receptor PAR-1 presente na superfície plaquetária, realizamos o ensaio de citometria de fluxo, marcando as plaquetas humanas com um anticorpo específico anti-PAR-1 humano.

### Porcentagem de inibição do influxo de cálcio intracelular induzido por trombina

<b>Compostos</b>	<b>200 <math>\mu</math>M</b>	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>
Indometacina	63,3 % $\pm$ 11,9	43,7 % $\pm$ 6,9	34,6 % $\pm$ 4,7
L-693	89,6 % $\pm$ 4,0	63,5 % $\pm$ 2,9	52,7 % $\pm$ 3,6
L-694	67,8 % $\pm$ 2,1	45,6 % $\pm$ 2,7	29,9 % $\pm$ 3,2
L-743	77,3 % $\pm$ 5,0	51,7 % $\pm$ 0,1	36,9 % $\pm$ 3,6
L-752	70,5 % $\pm$ 2,3	52,1 % $\pm$ 4,7	33,3 % $\pm$ 11,5

**Tabela 9:** Porcentagem de inibição dos compostos acilhidrazônicos (em diferentes concentrações) na mobilização de  $Ca^{+2}$  citoplasmático plaquetário, induzido por Trombina humana (1 UI/mL).

Todos os compostos, inclusive a Indometacina, foram incubados 1 minuto antes da incubação com anticorpo anti-PAR-1 e os resultados são mostrados nas Figuras 39 e 40. Obtivemos sucesso com a marcação plaquetária, como mostrado na Figura 39 A, e observamos que somente o composto LASSBio 752 (200  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de interferir na marcação do anticorpo específico, em aproximadamente 25 %, (Figura 39 F e 40), sugerindo talvez uma possível interação com o receptor PAR-1 responsável, pelo menos em parte, pela sua ação antiplaquetária.

## Porcentagem de inibição do influxo de cálcio intracelular induzido por TRAP-1

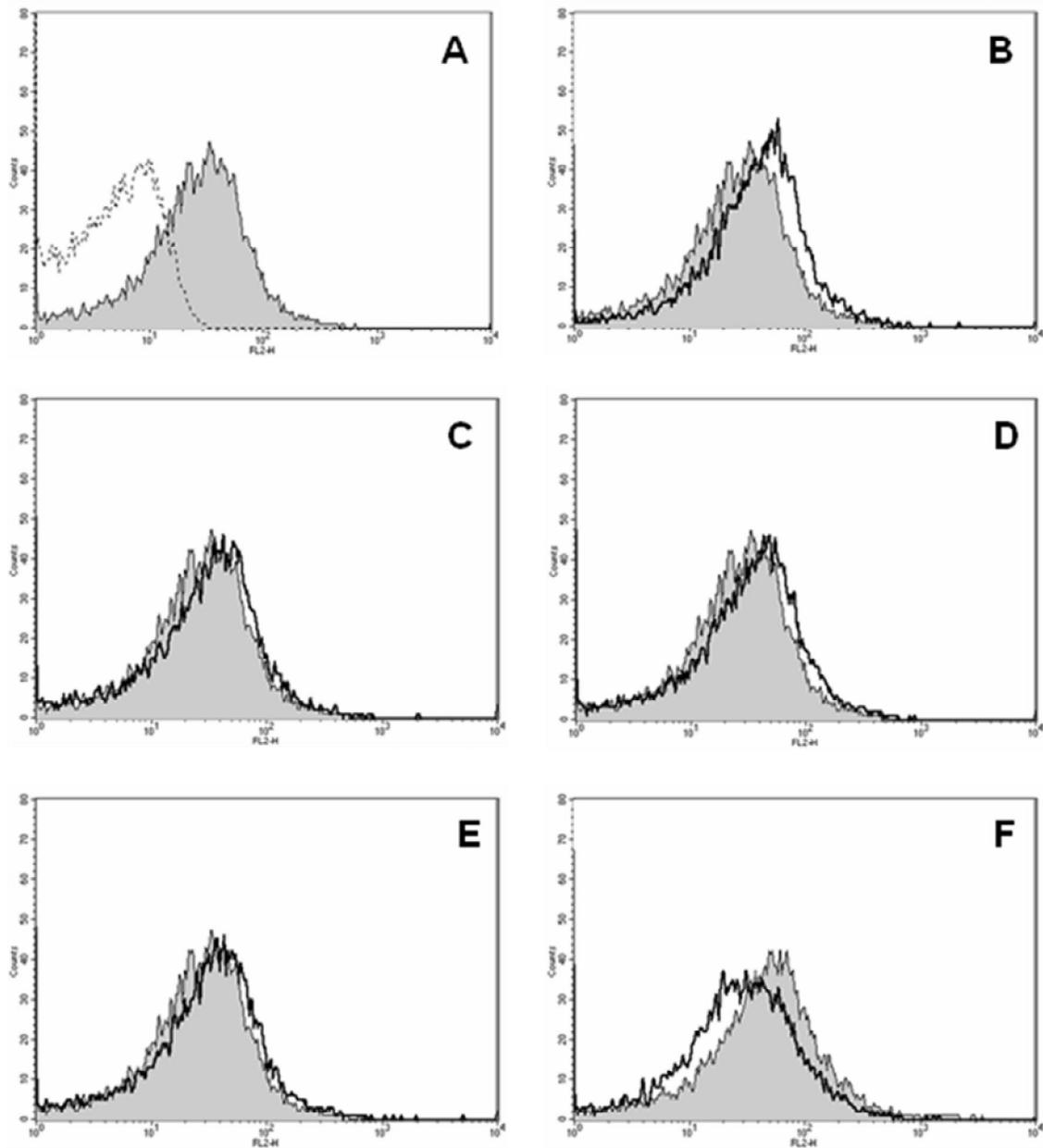
<b><i>Compostos</i></b>	<b><i>200 <math>\mu\text{M}</math></i></b>	<b><i>100 <math>\mu\text{M}</math></i></b>	<b><i>50 <math>\mu\text{M}</math></i></b>
Indometacina	58,8% $\pm$ 8,9	32,6% $\pm$ 14,7	16,6% $\pm$ 12,9
L-693	71,9% $\pm$ 8,6	51,2% $\pm$ 5,3	36,1% $\pm$ 3,8
L-694	44,8% $\pm$ 5,3	25,0% $\pm$ 1,1	21,5% $\pm$ 2,9
L-743	61,2% $\pm$ 5,8	29,9% $\pm$ 5,3	13,8% $\pm$ 3,7
L-752	71,7% $\pm$ 4,3	51,1% $\pm$ 7,6	13,7% $\pm$ 10,8

**Tabela 10:** Porcentagem de inibição dos compostos acilhidrazônicos (em diferentes concentrações) na mobilização de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático plaquetário, induzido por TRAP-1 (16  $\mu\text{M}$ ).

## Porcentagem de inibição do influxo de cálcio intracelular induzido por TRAP-4A

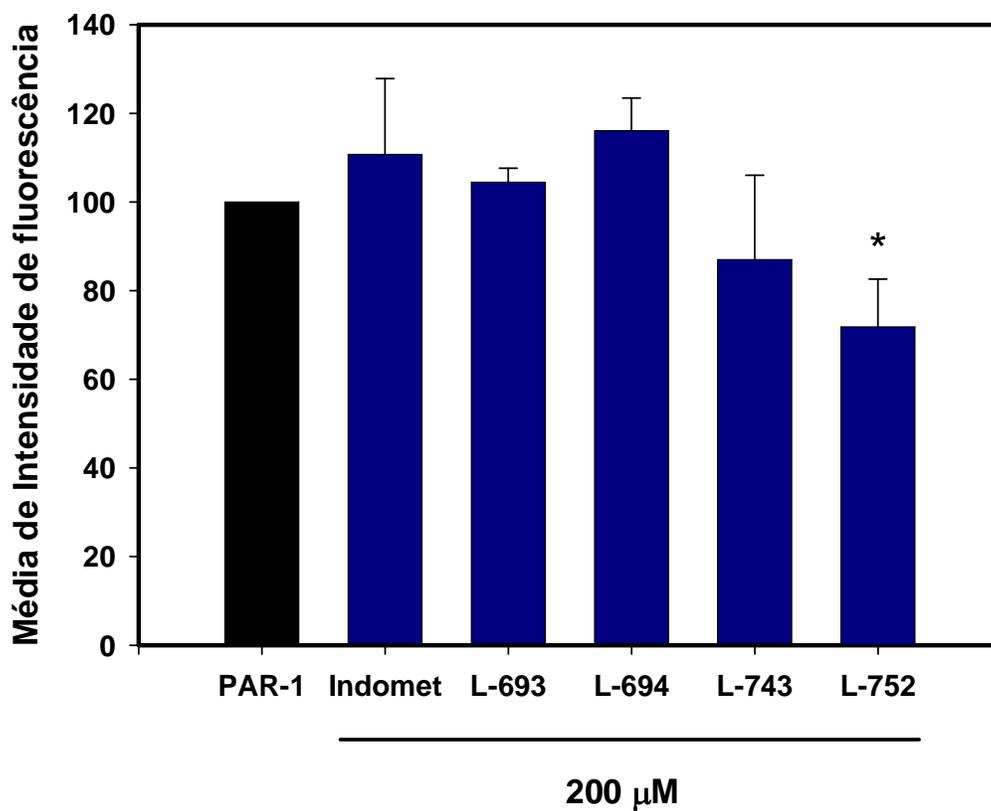
<b>Compostos</b>	<b>200 <math>\mu</math>M</b>	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>
Indometacina	76,9% $\pm$ 4,1	54,3% $\pm$ 2,9	40,6% $\pm$ 5,3
L-693	82,8% $\pm$ 3,7	65,3% $\pm$ 2,1	47,5% $\pm$ 2,2
L-694	42,9% $\pm$ 7,7	42,0% $\pm$ 9,6	23,2% $\pm$ 4,4
L-743	77,0% $\pm$ 5,2	41,9% $\pm$ 2,2	21,2% $\pm$ 6,4
L-752	54,1% $\pm$ 5,5	30,3% $\pm$ 5,0	20,9% $\pm$ 7,4

**Tabela 11:** Porcentagem de inibição dos compostos acilhidrazônicos (em diferentes concentrações) na mobilização de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático plaquetário, induzido por TRAP-4A (0,5 mM).



**Figura 39: Avaliação da interferência sobre a ligação de PAR-1**

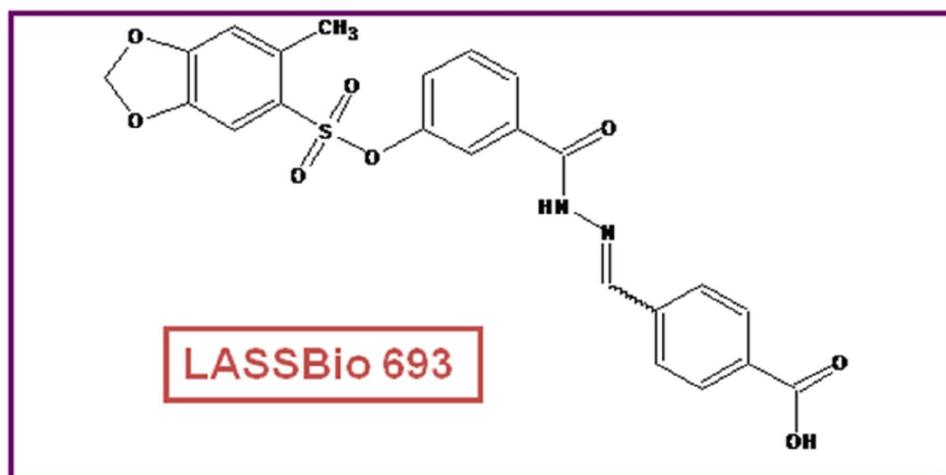
Experimento realizado por citometria de fluxo onde cada gráfico representa um n de cada experimento. Em **A**, plaquetas controle não marcadas (linha pontilhada) e marcação de PAR-1 (em cinza, para todos os gráficos), **B** Indometacina (linha preta), **C** LASSBio 693 (linha preta), **D** LASSBio 694 (linha preta), **E** LASSBio 743 (linha preta) e em **F** LASSBio 752 (linha preta).



**Figura 40: Interações com o receptor PAR-1.**

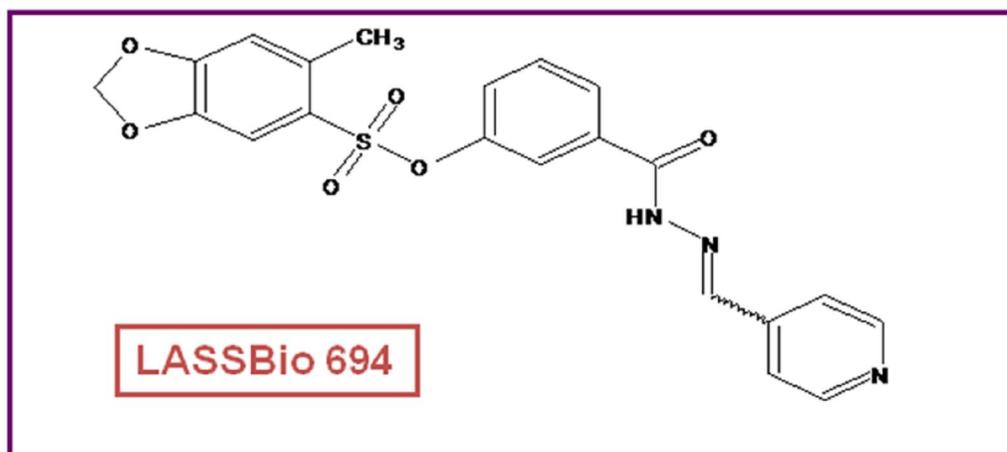
Os compostos foram incubados 1 minuto antes da incubação com anticorpo anti-PAR-1 humano. Cada ponto é uma média  $\pm$  SD de 3 experimentos. \*  $p < 0,05$

Sumarizamos a seguir os resultados mais relevantes encontrados para cada um dos compostos testados:

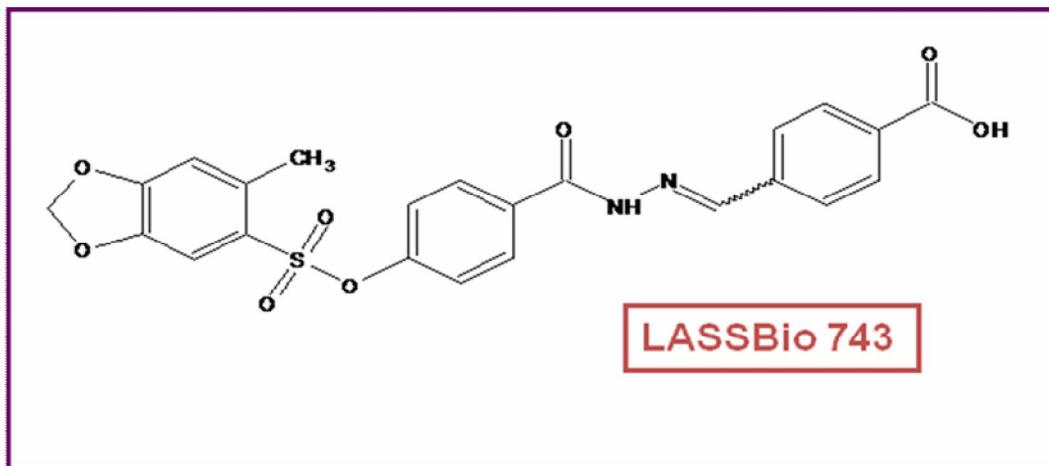


- O composto LASSBio 693 inibiu a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas de coelho, inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por trombina, TRAP-4A, colágeno e ADP, em plaquetas humanas, e induzida por trombina e TRAP-4A, em plaquetas de rato, sugerindo, duas vias de inibição, inibindo a via do receptor PAR-4 e talvez outra via comum de sinalização intracelular;
- Atua diretamente sobre a trombina, provavelmente modulando a atividade do sítio catalítico da enzima;
- Apresenta atividade antitrombótica significativa nos modelos de tromboembolia pulmonar induzido por colágeno e norepinefrina e por trombina;
- Inibe de forma bastante significativa a mobilização de cálcio intracelular plaquetário, induzida pelos três agonistas testados, trombina, TRAP-1 e TRAP-4A;

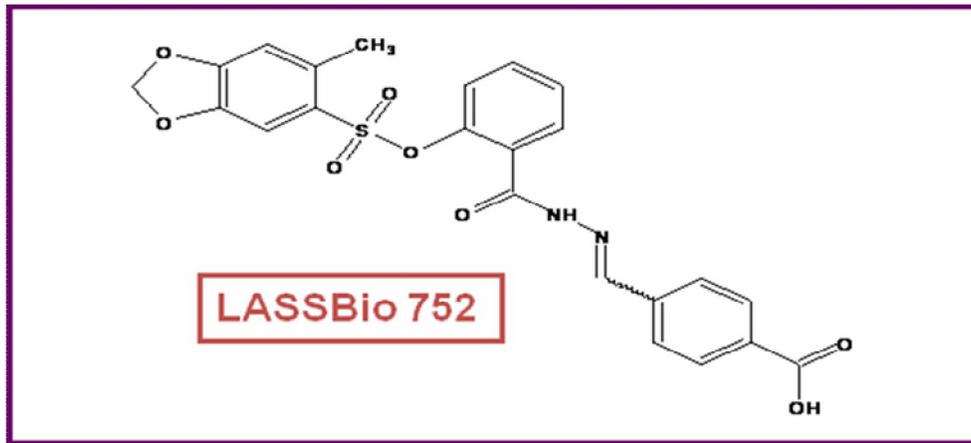
- Não foi capaz de competir com o anticorpo anti-PAR-1 pela ligação ao receptor PAR-1 em plaquetas humanas.



- O composto LASSBio 694 inibiu a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas de coelho, porém em plaquetas de rato e humanas apresentou um perfil muito parecido com a Indometacina (usada como controle positivo);
  - Não atua diretamente sobre a trombina;
  - Não apresenta atividade antitrombótica significativa no modelo de tromboembolia pulmonar;
  - Não foi capaz de interferir na ligação do anticorpo anti-PAR-1 na superfície do receptor PAR-1 em plaquetas humanas;
  - Inibe a mobilização de cálcio intracelular plaquetário, induzida pelos três agonistas testados, trombina, TRAP-1 e TRAP-4A.



- O composto LASSBio 743 inibiu a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas de coelho, inibiu agregação plaquetária induzida por trombina e TRAP-4A em plaquetas de rato e não inibiu significativamente a agregação plaquetária, em plaquetas humanas, induzida por todos os agonistas testados;
- Não atua diretamente sobre a trombina;
- Apresenta atividade antitrombótica bastante significativa nos modelos de tromboembolia pulmonar induzida por colágeno e norepinefrina e trombina;
- Apresenta atividade antitrombótica bastante significativa no modelo de trombose venosa profunda.
- Não foi capaz de interferir na ligação do anticorpo anti-PAR-1 com o receptor PAR-1 na superfície de plaquetas humanas;
- Inibe de forma bastante significativa a mobilização de cálcio intracelular plaquetário, induzida pelos três agonistas testados, trombina, TRAP-1 e TRAP-4A.



- O composto LASSBio 752 inibiu a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas de coelho e de rato e inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida tanto por trombina como por TRAP-1 em plaquetas humanas, parecendo interferir na via de sinalização do receptor PAR-1, com uma possível ação direta sobre o receptor;
- Não atua diretamente sobre a trombina;
- Apresenta atividade antitrombótica bastante significativa nos modelos de tromboembolia pulmonar induzida por colágeno e norepinefrina e por trombina;
- Apresenta atividade antitrombótica, tempo dependente, bastante significativa no modelo de trombose venosa profunda;
- Apresenta atividade antitrombótica, tempo dependente, bastante significativa no modelo de trombose arterial;
- Foi capaz de competir com o anticorpo anti-PAR-1 pela ligação ao receptor PAR-1 em plaquetas humanas;
- Inibe de forma bastante significativa a mobilização de cálcio intracelular plaquetário, induzida pelos três agonistas testados, trombina, TRAP-1 e TRAP-4A.

O estudo de inibidores naturais ou sintéticos do processo hemostático assim como a elucidação estrutural detalhada da especificidade enzimática e da estrutura de receptores plaquetários é importantes fontes de informação para a determinação de novas drogas antitrombóticas. Desta forma, devido a potencial importância em processos fisiopatológicos, atualmente existe um enorme investimento das indústrias farmacêuticas e de grupos de pesquisa para o desenvolvimento de inibidores sintéticos altamente específicos.

Nesta tese é descrita uma série de novos derivados acilhidrazônicos, onde após um estudo inicial, os mais promissores foram os compostos LASSBio 693, LASSBio 694, LASSBio 743 e LASSBio 752, que atuam como inibidores da agregação plaquetária, influenciando, pelos dados obtidos até o momento, na modulação do influxo intracelular de cálcio plaquetário. Os compostos LASSBio 693 e LASSBio 752 possivelmente atuam através da inibição das vias dos receptores específicos para a trombina, denominados PAR. A partir dos resultados obtidos é necessário verificar também a possível inibição da formação de tromboxana  $A_2$  que pode contribuir para o mecanismo de ação destas drogas. Assim, os derivados acilhidrazônicos aqui estudados teriam uma aplicação potencial no tratamento de sintomas de doenças cardiovasculares (STIGES e col., 2000, MACKMAN, 2008).

Inúmeros compostos derivados acilhidrazônicos têm sido descritos na literatura como inibidores da agregação plaquetária (REIS e col., 1999; CUNHA e col., 2003). Os derivados acilhidrazônicos descritos neste trabalho foram desenhados a partir dos protótipos argotrobano e sulfonato e planejados

racionalmente como inibidores de trombina (BARREIRO e col., 2004, LIMA, 2008).

O efeito de baixas concentrações de trombina, na ordem de 0,5 nM, em plaquetas, *in vitro*, é bem estabelecido e parece ser mediado principalmente por um receptor de alta afinidade na superfície destas células, denominado PAR-1 (KAHN e col., 1998, COUGHLIN, 1998). Estudos também indicam que a clivagem de PAR-1 ocorre em concentrações fisiológicas de trombina, sendo esta ação de grande importância para regiões de fluxo sanguíneo rápido. Também é relatada a ocorrência de um receptor de baixa afinidade denominado PAR-4. A clivagem deste receptor requer concentrações mais altas de trombina, na ordem de 30 nM e seu papel fisiológico ainda é incerto (KAHN e col., 1997).

Os receptores do tipo PAR são expressos em vários tipos celulares, estando, portanto, envolvidos também em processos distintos do sistema de coagulação. Esses receptores estão também presentes em sistemas como trato gastrointestinal, sistema nervoso, além de estarem presentes na pele e nas vias aéreas, entre outros. Estão também envolvidos em doenças inflamatórias e presentes em células tumorais (OSSOVSKAYA e BUNNETT, 2004, SOSLAU e col., 2008).

As plaquetas humanas expressam PAR-1 e PAR-4, enquanto as plaquetas de rato expressam PAR-3 e PAR-4. Em plaquetas de rato o receptor PAR-3 serve como um co-receptor para PAR-4, a trombina se liga em PAR-3 e cliva o receptor PAR-4 na região N-terminal (KAHN e col., 1998 e MAO, 2008). Os ensaios de agregação plaquetária demonstraram que o composto LASSBio 693 inibiu

efetivamente a agregação plaquetária induzida por Trombina, em plaquetas de coelho, rato ( $IC_{50} = 184,7 \mu M$ ) e humanas ( $IC_{50} = 191 \mu M$ ) e por TRAP-4A tanto em plaquetas de rato ( $IC_{50} = 151,1 \mu M$ ) quanto em plaquetas humanas ( $IC_{50} = 103 \mu M$ ), de forma parecida a um inibidor já descrito na literatura, o YD-3, que foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por TRAP-4A, em plaquetas de coelho ( $IC_{50} = 28,3 \mu M$ ) e plaquetas humanas ( $IC_{50} = 0,13 \mu M$ ), sem mostrar muito efeito na agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico, colágeno, PAF ou U46619 (WU, 2000, 2002).

Por outro lado, este composto também inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno ( $IC_{50} = 70 \mu M$ ) e ADP ( $IC_{50} = 191 \mu M$ ) em plaquetas humanas, embora demonstrando um perfil distinto daquele apresentado pela Indometacina e não foi capaz de inibir de forma efetiva a agregação induzida por ADP ( $IC_{50} = 394,8 \mu M$ ) em plaquetas de rato. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que o composto LASSBio 693 apresenta dois mecanismos de inibição da agregação plaquetária em plaquetas humanas: um possivelmente inibindo a via do receptor PAR-4 e outro provavelmente inibindo uma via comum a todos os receptores, como por exemplo a formação de tromboxana  $A_2$ , mas não em plaquetas de rato, porém ambas as hipóteses necessitam ainda de comprovação experimental. Outra característica importante observada para este composto foi seu efeito inibitório na mobilização intracelular de cálcio. Ele foi capaz de inibir, na concentração de  $200 \mu M$ ,  $89,6 \pm 4,0 \%$  da mobilização durante a indução por trombina,  $71,9 \pm 8,6 \%$  durante a indução por TRAP-1 e  $82,8 \pm 3,7 \%$  durante a

indução por TRAP-4. Sendo o composto que obteve a maior porcentagem de inibição com os três agonistas testados.

Lactams bicíclicos são inibidores de trombina já bem descritos na literatura, e são conhecidos por sua ação inibitória rápida, apresentando  $K_i < 10$  nM e por serem bastante seletivos, não sendo capazes de inibir outras proteases de coagulação (LEBLOND e col., 2000). Além desta classe, outros tipos de inibidores, também seletivos para a enzima, são bem conhecidos como ximelagatran, lepirudina e dabigatran (WONG, e col., 2007 e MACKMAN, 2008). No entanto, avaliando a possível ação inibitória direta sobre a trombina, observamos que somente o composto LASSBio 693 mostrou algum efeito inibitório sobre a atividade amidolítica da trombina, evidenciado pelo ensaio utilizando substrato cromogênico (S-2238), Esta observação sugere fortemente que o composto LASSBio 693 poderia modular diretamente o sítio catalítico da trombina, uma vez que o substrato S-2238, de baixo peso molecular, interage diretamente com o seu sítio ativo, sem apresentar interação com nenhuma outra região da enzima. Curiosamente o mesmo composto não foi capaz de inibir a fibrinocoagulação, sugerindo que a interação do fibrinogênio a sítios distintos do sítio catalítico pode dificultar a inibição por este composto. Por outro lado, nenhum dos compostos induziu o prolongamento do tempo de coagulação, o que indica que eles não possuem ação anticoagulante, uma atividade esperada para inibidores diretos de trombina como ximelagatran e argatroban (NILSSON e col., 1998 e HO e BRIGHTON, 2006).

O mecanismo de ação mais aceito para os efeitos antitrombóticos observados para a aspirina é a inativação irreversível da atividade da enzima

ciclooxigenase, tipo-1: COX-1 e tipo-2: COX-2, levando à inibição da síntese de tromboxana A<sub>2</sub> em plaquetas. A indometacina age de forma semelhante à aspirina inibindo a enzima COX (PATRONO e col., 2001, OFFERMANN, 2007). O composto LASSBio 694 apresentou um perfil de inibição da agregação plaquetária bastante similar à indometacina, uma vez que este composto apresentou porcentagens de inibição bem parecidas em todos os ensaios de agregação plaquetária realizados. Desta forma, não descartamos a possibilidade de que o composto LASSBio 694 também possa inibir a formação de tromboxana A<sub>2</sub>, possivelmente por inibição da enzima COX, sendo necessário uma análise mais criteriosa sobre a atividade do composto diretamente sobre esta enzima.

Consideráveis evidências suportam um papel relevante para o complexo GPIIb/IIIa, presente na superfície das plaquetas, na ativação plaquetária induzida por trombina (DE CANDIA e DE CRISTOFARO, 2003; YOSHIOKA e col., 2004). De fato, a adesão plaquetária ao vaso lesado, via GPIIb/IIIa desencadeia a formação de trombos. Isto tem sido evidenciado por experimentos *in vitro* que indicam que a interação GPIIb/IIIa-vWF é crucial na fase inicial de formação dos trombos. Embora o composto LASSBio 743 tenha sido capaz de inibir moderadamente a agregação plaquetária induzida por trombina, em plaquetas humanas (IC<sub>50</sub> > 195 µM), este não mostrou inibição significativa quando a agregação foi induzida pelos agonistas diretos dos receptores PAR, colágeno ou ADP. Uma hipótese para estas observações seria a de que o composto LASSBio 743 estivesse se ligando a um outro receptor de trombina na superfície da plaqueta, possivelmente o receptor GPIIb. Esta hipótese é reforçada por ensaios que demonstraram que este composto não interfere com a atividade enzimática da

trombina, porém existem ainda outras hipóteses possíveis para a atividade do composto LASSBio 743, como uma possível ação no endotélio vascular, modificando suas características pró-trombóticas ou ainda uma possível metabolização, levando a formação de um metabólito mais ativo. Em plaquetas de rato a inibição da agregação induzida por trombina e TRAP-4A também foi moderada, mas observamos um perfil diferente em relação à atividade direcionada para o receptor PAR-4, já que em plaquetas humanas não houve nenhuma inibição.

O composto LASSBio 752, inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por trombina ( $IC_{50} = 109,8 \mu M$ ) em plaquetas de rato e por trombina ( $IC_{50} = 109,2 \mu M$ ), TRAP-1 ( $IC_{50} = 131 \mu M$ ), em plaquetas humanas, mas não mostrou inibição significativa quando a agregação foi induzida por colágeno e ADP, sugerindo que a interferência mais efetiva deste composto seria sobre o receptor PAR-1, ou sua via de ativação. O antagonismo do receptor PAR-1 é de grande importância para o controle da atividade plaquetária e, por conseguinte, uma série de antagonistas já foram desenvolvidos, incluindo antagonistas peptídeo miméticos e não miméticos. Entre os antagonistas peptídico miméticos podemos citar RWJ-53052 que inibe a agregação plaquetária induzida por SFLLRN-NH2 ( $IC_{50} = 0,27 \mu M$ ) e induzida por trombina ( $IC_{50} = 2,32 \mu M$ ), em plaquetas humanas, e RWJ-56110 que inibe a agregação plaquetária induzida por SFLLRN-NH2 ( $IC_{50} = 0,16 \mu M$ ) e induzida por trombina ( $IC_{50} = 0,34 \mu M$ ), também em plaquetas humanas (ANDRADE-GORDON e col., 1999). Outro antagonista peptídico mimético é o BMS-200261, que inibe a agregação plaquetária induzida por SFLLRN-NH2 ( $IC_{50} = 0,0075 \mu M$ ) e induzida por trombina ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ), também

em plaquetas humanas (BERNATOWICZ e col., 1996).

SCH-79797 é um antagonista não mimético do receptor PAR-1, que inibe a agregação plaquetária induzida por trombina ( $IC_{50} = 3 \mu M$ ), e induzida por TRAP (PAR-1) ( $IC_{50} = 300 nM$ ) também em plaquetas humanas (ANH e col., 2000).

Uma característica importante para um composto inibidor de PAR, seria sua atuação direta sobre o receptor PAR-1 ou em sua via de sinalização. Avaliando o papel direto do composto LASSBio 752 sobre este receptor, observamos que o composto, quando incubado antes da adição do anticorpo anti-PAR1 consegue inibir em aproximadamente 25 % a ligação do anticorpo nos receptores. Este dado sugere uma ação direta sobre o receptor, mesmo esta interferência não sendo em grandes proporções, pois não sabemos ao certo em qual ou quais posições o composto pode se ligar ao receptor.

Outro dado importante foi sua capacidade inibitória sobre a mobilização de cálcio intracelular, sendo capaz de inibir, na concentração de  $200 \mu M$ ,  $70,5 \pm 2,3$  % da mobilização durante a indução por trombina e  $71,7 \pm 4,3$  % durante a indução por TRAP-1. Sua atividade foi menos evidenciada na indução por TRAP-4, inibindo apenas  $54,1 \pm 5,5$  %. Este resultado não descarta a hipótese anterior, de que o composto LASSBio 752 pode se ligar direto ao receptor, uma vez que a inibição direta do receptor consequentemente ocasionará uma diminuição no influxo intracelular de cálcio.

A trombose é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental (GRESELE e AGNELLI, 2002, SACHS e NIESWANDT, 2007). A trombose arterial é geralmente iniciada por ruptura mecânica ou espontânea de placas ateroscleróticas, um processo que expõe material trombogênico no

arcabouço rico em lipídeos da placa de ateroma no sangue. O trombo arterial, que é formado em condições de fluxo rápido, é composto por plaquetas agregadas junto à rede de fibrina. A patogênese da trombose venosa e do tromboembolismo venoso (TEV) é multifatorial, envolvendo frequentemente fatores de risco adquiridos ou ambientais, assim como uma predisposição genética. O trombo venoso consiste principalmente de fibrina e células vermelhas. A trombose venosa se desenvolve em condições de fluxo lento, e geralmente se origina em veias profundas de membros inferiores. Acredita-se que a coagulação nesses sítios é iniciada principalmente por trauma vascular e é aumentada por estase venosa (WEITZ e HIRSH, 2001).

As drogas atuais para a prevenção e o tratamento da tromboembolia venosa (VTE) incluem a heparina, heparinas de baixo peso molecular e warfarina. Uma vez que esses compostos possuem diversas desvantagens, como por exemplo, sangramentos e trombocitopenia, inúmeros trabalhos estão sendo realizados na busca de melhores drogas anticoagulantes. Neste contexto, as drogas mais promissoras incluem a proteína TFPI, os inibidores do fator IX, os inibidores do Xa e inibidores seletivos da trombina (heparina oral, ximelagatran) (PRANDONI e col., 2001; 2003; CHANG, 2004, MACKMAN, 2008).

Diversos estudos em modelos de trombose induzida em animais têm enfatizado a importância da presença de plaquetas e de trombina na trombogênese (VAN-ZYL e col., 2000; SACHS e NIESWANDT, 2007). Um grande número de modelos experimentais foi estabelecido para permitir a observação *in vivo* da formação de trombos, principalmente modelos utilizando ratos e

camundongos como animais de experimentação. O primeiro modelo testado foi o de tromboembolia pulmonar, em camundongos. O modelo induzido por colágeno e norepinefrina avalia um efeito mais focado para as plaquetas, uma vez que, a presença de colágeno no sangue mimetiza um processo de injúria vascular, onde seria exposto o subendotélio, que é rico nesta proteína, e nestes casos teríamos as plaquetas como primeiras células a se aderirem no local da lesão, iniciando a hemostasia primária (NIESWANDT e WATSON, 2003, MACKMAN, 2008). No entanto, quando a indução da tromboembolia pulmonar é feita por trombina, além da capacidade da enzima em ativar plaquetas, contamos com suas outras funções fisiológicas, que inclui a ativação de outros fatores plasmáticos da coagulação, e esta ativação culminará em uma maior geração de trombina. Portanto, além da participação plaquetária inicial, observamos também uma grande participação da cascata de coagulação logo no início da formação dos trombos, e principalmente da ação destes compostos na própria trombina (MOMI e col., 2001). No modelo de trombose venosa profunda trabalhamos com dois fatores cruciais para a formação de trombo: a hipercoagulabilidade, quando administramos trombolastina cálcica, e a estase sanguínea, que devido ao fechamento dos segmentos vasculares, para a circulação sanguínea local, aumenta a probabilidade do encontro e ativação dos fatores de coagulação.

O composto LASSBio 693 mostrou um grande potencial antitrombótico quando a tromboembolia pulmonar foi induzida por colágeno e norepinefrina ou por trombina, aumentando consideravelmente a porcentagem de sobrevivência dos animais tratados que foi em torno de 60-70 % em relação ao grupo não tratado que foi de 20-30 %. Já no modelo de trombose venosa este composto não

apresentou efeito significativo. Este composto mostrou um efeito inibitório mais significativo em relação ao ensaio de agregação plaquetária via receptor PAR-4, em plaquetas humanas e de rato. Corroborando com esta atividade, este composto se mostrou mais eficaz no modelo de tromboembolia pulmonar induzido por colágeno, que possui uma grande participação das plaquetas na fase inicial da formação do trombo, e induzido por trombina, que já possui uma maior participação da cascata de coagulação. Já no modelo de trombose venosa, induzido por tromboplastina, que também tem uma grande participação dos fatores de coagulação, nenhum efeito foi verificado.

O composto LASSBio 743 apresentou um potencial antitrombótico muito grande, aumentando significativamente a porcentagem de sobrevivência dos animais que foi em torno de 80 % em relação aos grupos controles nos dois ensaios de tromboembolia pulmonar realizados. Ele também apresentou um efeito bastante significativo no modelo de trombose venosa, inibindo em  $75,7 \pm 0,7$  % a formação de trombo, comparado ao grupo controle (11,0 g). O mecanismo de ação deste composto, nestes modelos, ainda não está bem esclarecido, pois sua ação antitrombótica não é bem explicada através dos resultados obtidos nos ensaios plaquetários, de coagulação ou avaliando seu efeito direto sobre a trombina. Devido ao grande potencial antitrombótico demonstrado, este composto requer a continuidade da investigação da sua atividade antitrombótica e ainda a busca pelo esclarecimento do seu mecanismo de ação.

O composto LASSBio 752 foi o mais estudado quanto ao seu potencial antitrombótico. Ele aumentou a porcentagem de sobrevivência dos animais

tratados, que foi de 50 % em relação ao grupo não tratado 20-30 % no modelo de tromboembolia pulmonar induzido por colágeno, e mostrou uma maior atividade quando o ensaio foi induzido por trombina. Estes resultados corroboram, então, com os resultados mostrados nos ensaios de agregação plaquetária, onde este composto mostrou uma maior atividade inibitória quando testado para agregação induzida por trombina e TRAP-1, em plaquetas humanas e induzido por trombina em plaquetas de rato e também com os observados nos ensaios de coagulação sanguínea *ex vivo*. De uma forma geral, os resultados aqui mostrados apontam para uma proteção importante contra a mortalidade induzida nos modelos de tromboembolia pulmonar. Observamos uma atividade também bastante significativa no modelo de trombose venosa profunda, mostrando um efeito tempo dependente na concentração de 100  $\mu\text{mol/kg}$ , o que provavelmente pode ter ocorrido devido à boa absorção intestinal dos compostos, aumentando sua biodisponibilidade, uma vez que o efeito aumenta de forma diretamente proporcional ao aumento do intervalo de tempo entre a administração e a indução da trombose. O mesmo podemos observar para o modelo de trombose arterial, onde o composto apresentou o mesmo perfil inibitório, mostrando que sua ação está relacionada tanto à formação do trombo venoso quanto ao arterial.

A avaliação da atividade destes compostos nos ensaios *in vivo*, foi de grande importância, uma vez que, levou a confecção de uma patente e também por apresentarem grande possibilidade de se tornarem candidatos à fármacos. Naturalmente, ainda são necessários estudos adicionais, para determinação de

toxicidade, biodisponibilidade, farmacocinética e farmacodinâmica, para que algum desses compostos possa ser utilizado em ensaios clínicos.

- Os compostos (LASSBio 693, 743 e 752) da série de derivados acilhidrazônicos apresentaram ação antiplaquetária específica para trombina, com exceção do composto LASSBio 694. Interferindo com a mobilização de cálcio intracelular.

- Os compostos não apresentam atividade anticoagulante, comprovado pela ausência de efeito nos ensaios de coagulação *in vitro* e *ex vivo*.

- No modelo de tromboembolia pulmonar, todos os compostos mostraram atividade antitrombótica, apresentando potenciais diferentes. Os mais potentes foram os compostos LASSBio 752 e LASSbio 743.

- O composto LASSBio 752 mostrou atividade antitrombótica bastante significativa nos modelos de trombose venosa e arterial. Seu efeito foi tempo-dependente, aumentando progressivamente até o intervalo de 24 horas, sem, no entanto, apresentar efeito hemorrágico.

- O composto LASSBio 743 merece uma melhor investigação do potencial antitrombótico.

- Estes resultados indicam que os compostos LASSBio 752 e LASSBio 743 podem ser potenciais candidatos para o tratamento de trombose.

- ADAM, F.; BOUTON, M.; HUISSE, M.; JANDROT-PERRUS, M. (2003) Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Iba. *Trends in Molec. Medic.* 9, 461-464.
- AHMAD, S.S.; RAWALA-SHEIKH, R.; WALSH, P.N. (1992) Components and assembly of the factor X activating complex. *Thromb. Haemost.* 18, 311-323.
- AHN, H.S.; FOSTER, C.; BOYKOW, G.; STAMFORD, A.; MANNA, M.; GRAZIANO, M. (2000). Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol.* 60 (10), 1425-1434.
- ANDRADE-GORDON, P.; MARYANOFF, B.E.; DERIAN, C.K.; ZHANG, H.C.; ADDO, M.F.; DARROW, A.L.; ECKARDT, A.J.; HOEKSTRA, W.J.; MCCOMSEY, D.F.; OKSENBERG, D.; REYNOLDS, E.E.; SANTULLI, R.J.; SCARBOROUGH, R.M.; SMITH, C.E.; WHITE, K.B. (1999). Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (22), 12257-12262.
- ANDREWS R.K.; BERNDT, M.C. (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res.* 114, 447-453.
- ARNI, R.K.; PADMANABHAN, K.; PADMANABHAN, K.P.; WU, T.P.; TULINSKY, A. (1993) Structure of noncovalent complexes of human and bovine fragment 2 with human PPACK-thrombin. *Biochemistry.* 32, 4727-4737.
- ASAKURA, H.; OKUDAIRA, M.; ONTACHI, Y.; MIZUTANI, T.; OMOTE, M.; YOSHIDA, T.; KANEDA, M.; YAMAZAKI, M.; MORISHITA, E.; TAKAMI, A.; MIYAMOTO, K.; NAKAO, S. (2004) Antithrombotic role of nitric oxide in rats under physiological conditions. *Thromb. Haemost.* 91, 71-75.
- BADIMON, L.; VILAHUR, G. (2008) Coronary Atherothrombotic Disease: Progress in Antiplatelet Therapy. *Rev. Esp. Cardiol.* 61 (5), 501-513.

BARREIRO, E.J.; ZINGALI, R.B.; FRATTANI, F.S.; LIMA, L.M.; FRAGA, C. INPI. PI-0403105-9. Depositada em 16/07/2004.

BERGMEIER, W.; STEFANINI, L. (2009) Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 187–190.

BERNATOWICZ, M.S.; KLIMAS, C.E.; HARTL, K.S.; PELUSO, M.; ALLEGRETTO, N.J.; SEILER, S.M. (1996). Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *J. Med. Chem.* 39 (25), 4879-4887.

BHATT, D.L.; TOPOL, E.J. (2003) Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2, 15-28.

BIANCHINI, E.P.; LOUVAIN, V. B. ; MARQUE, P.E.; JULIANO, M. A. ; JULIANO L.; BONNIEC, B.F. (2002) Mapping of the Catalytic Groove Preferences of Factor Xa Reveals an Inadequate Selectivity for Its Macromolecule Substrates. *J. Biol. Chem.* 277, 20527–20534.

BICK, R.L.; FAREED, J. (1997). Current status of thrombosis: A multidisciplinary medical issue and major American health problem beyond the year 2000. *Clinic. Appl. Thromb. Hemost.* 3, S1.

BLUTEAU, D.; LORDIER, L.; DI STEFANO, A.; CHANG, Y.; RASLOVA, H.; DEB ILI, N.; VAINCHENKER, W. (2009) Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 227–234.

BOCK, P.E. (1992) Active-site-selective labeling of blood coagulation proteinases with fluorescence probes by the use of thioester peptide chloromethyl ketones. I. Specificity of thrombin labeling. *J. Biol. Chem.* 267, 14963-14973.

BODE, W.; HUBER, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204, 433-451.

BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. (1963) The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 168, 178 - 195.

- BOUMA, B.N.; MEIJERS, J.C.M. (2003) Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *J. Thromb. Haemost.* 1, 1566–1574.
- BOURIN, M.C.; LINDAHL, U. (1993) Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem. J.* 289, 313-330.
- BRASS, L.F. (1995) Molecular basis for platelet activation. Em: *Hematology. Basic principles and practice* (Eds: Hoffman, R., Benz, E.J., Jr., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J. & Silberstein, L.E.), Churchill Livingstone Inc., New York, USA, 1536-1551.
- BRUFATTO, N.; NESHEIM, M.E. (2002) Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process. *J. Biol. Chem.* 278, 6755-6764.
- BUICHEIMER, R.E.; LINDEN, J. (2003) Purinergic regulation of epithelial transport. *Physiol. Soc.* 555, 311-321.
- BUDDAI, S.K.; TOULOKHONOVA L.; BERGUM P.W.; VLASUK G.P.; KRISHNASWAMY S. (2002) Nematode Anticoagulant Protein c2 Reveals a Site on Factor Xa That Is Important for Macromolecular Substrate Binding to Human Prothrombinase. *J. Biol. Chem.* 277, 26689–26698.
- CASTELLINO, F.J.; PLOPIS, V.A. (2009) The protein C pathway and pathologic processes. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 140–145.
- CATTANEO, M. (2009) New P2Y12 blockers. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 262–265.
- CHANG, P. (2004) New anticoagulants for venous thromboembolic disease. *Drugs.* 7 (1), 50-57.
- CHAO, W.; OLSON, M.S. (1993) Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 292, 617-629.

COBEA (Colegio Brasileiro de Experimentação Animal) (1934). Lei nº 6638, 8 de Maio, 1979 e Lei nº 24645, 10 de julho.

COLLER, B.S.; PEERSCHKE, E.I.; SCUDDER, L.E.; SULLIVAN, C.A. (1983). A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa . *J. Clin. Invest.* 72, 325.

COMMITTEE ON ANIMAL RESEARCH AND ETHICS (CARE) Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals developed by APA's <http://www.apa.org/science/anguide.html>.

COUGHLIN, S.R. (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11023-11027.

COUGHLIN, S.R.; KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W.; BIGORNIA, V.; ZENG, D.; MOFF, S.; FARESE, R.V.JR.; TAM, C. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394, 690-694.

CUNHA, A.C.; FIGUEIREDO, J.M.; TRIBUTINO, J.L.; MIRANDA, A.L.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; FRAGA, C.A.; SOUZA, M.C.; FERREIRA, V.F.; BARREIRO, E.J. (2003) Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 11(9), 2051-9.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. (1991). The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry.* 30, 103631-103639.

DE CANDIA, E.; DE CRISTOFARO, R. (2003) Thrombin Domains: Structure, Function and Interaction with Platelet Receptors. *J. Thromb. Thrombol.* 15 (3), 151–163.

DI CERA, E. (2003) Thrombin Interactions. *Chest* 124, 11S–17S.

- DUBOIS, C.; STEINER B.; MEYER REIGNER S.C. (2004). Contribution of PAR-1, PAR-4 and GPIIb/IIIa in intracellular signaling leading to the cleavage of the  $\beta$ 3 cytoplasmic domain during thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* 91, 733-742.
- EITZMAN, D.T.; BODARY, P.F.; SHEN, Y.; KHAIRALLAH, C.G.; WILD, S.R.; ABE, A.; SHAFFER-HARTMAN, J.; SHAYMAN, J.A. (2003) Fabry disease in mice is associated with age-dependent susceptibility to vascular thrombosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2), 298-302.
- ERUSALIMSKY, J.D.; MARTIN, J.F. (1996) Cellular model systems to study megakaryocyte differentiation. Platelets- A practical approach, ch. 2, 27-45. Editado por: SP Watson and KS Authi, The Practical Approach Series, Oxford University Press Inc., New York.
- ESMON, C.T. (2000) Regulation of blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 349-360.
- ESMON, C.T.; FUKUDOME, K.; MATHER, T.; BODE, W.; REGAN, L.M.; STEARNS-KUROSAWA, D.J.; KUROSAWA, S. (1999) Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 84, 254-259.
- FARIAS, W.R.L. (2000) Estrutura e atividade anticoagulante e antitrombótica de galactanas sulfatadas da alga vermelha *Botryocladia occidentalis*. Tese para obtenção do grau de doutor, Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
- FARUQI, T.R.; WEISS, E.J.; SHAPIRO, M.J.; HUANG, W.; COUGHLIN, S.R. (2000) Structure-Function Analysis of Protease-activated Receptor 4 Tethered Ligand Peptides. *J. Bio. Chem.* 275, 19728–19734.
- FAZIO S.; LINTON M.F. (2004) Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 116-123.

- FENTON, J.W.; FASCO, M.J.; STACKROW, A.B.; ARONSON, D.L.; YOUNG, A.M.; FINLAYSON, J.S. (1977) Human thrombins. Production, evaluation and properties of  $\alpha$ -thrombin. *J. Biol. Chem.* 252, 3587-3598.
- FRANCISCHETTI, I.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. (1998) Bothrops sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119 (1), 21-29.
- FURIE B.; FURIE B.C. (1992) Molecular and cellular biology of blood coagulation. *New Eng. J. Med.* 326, 800-806.
- FURLAN, M. (2002) Sticky and promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. *Swiss. Med. Wkly.* 132, 181–189.
- GENTRY, P.A. (2004) Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterin. J.* 168, 238–251.
- GIBBINS, J.; ASSELIN, A.; FARNDAL, R.; BARNES, M.; CHE-LEUNG, L.; WATSON, S.P. (1996) Tyrosine Phosphorylation of the Fc Receptor  $\alpha$ -Chain in Collagen-stimulated Platelets. *J. Biol. Chem.* 271, 18095–18099.
- GIBBS, C.S.; COUTRE, S.E.; TSIANG, M.; LI, W.X.; JAIN, A.K.; DUNN, K.E.; LAW, V.S.; MAO, C.T.; MATSUMURA, S.Y.; MEJZA, S.J. (1995) Conversion of thrombin into an anticoagulant by protein engineering. *Nature.* 378, 413-416.
- GOLDHABER, S.Z. (2009) Advanced treatment strategies for acute pulmonary embolism, including thrombolysis and embolectomy. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 322–327.
- GOODWIN, C.A.; WHEELER-JONES, C.P.; KAKKAR, V.V.; DEADMAN, J.J.; AUTHI, K.S.; SCULLY, M.F. (1994) Thrombin receptor activating peptide does not stimulate platelet procoagulant activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 321-327.

- GRESELE, P.; MOMI, S.; BERRETTINI, M.; NENCI, G.G.; SCHWARZ, H.P.; SEMERARO, N.; COLUCCI, M. (1998) Activated Human Protein C prevents thrombin-induced thromboembolism in mice. Evidence that activated protein c reduces intravascular fibrin accumulation through the inhibition of additional thrombin generation. *Amer. Soc. Clin. Investig.*, 101, 667-676.
- GRESELE, P.; AGNELLI, G. (2002) Novel approaches to the treatment of thrombosis *TRENDS in Pharmac. Scienc.* 23, 25-32.
- GRIGNANI, G.; MAIOLO, A. (2000) Cytokines and hemostasis. *Haematologica* 85, 967-972.
- GUDMUNDSDÓTTIR, I.J.; LANG, N.N.; BOON, N.A.; LUDLAN, C.A.; WEBB, D.J.; FOX, K.A.; NEWBY, D.E. (2008) Role of the Endothelium in the Vascular Effects of the Thrombin Receptor (Protease-Activated Receptor Type 1) in Humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51 (18), 1749-1756.
- GUILLIN M.C., BEZEAUD A., BOUTON M.C.; JANDROT-PERRUS M. (1995) Thrombin specificity. *Thromb. Haemost.* 74, 129-133.
- HACKENG, T.M.; MAURISSEN, L.F.A.; CASTOLDI, E.; ROSING, J. (2009) Regulation of TFPI function by protein S. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 165–168.
- HAWIGER, J.; KLOCZEWIAK, M.; TIMMONS, S. (1985). Platelet-receptor mechanism for adhesive macromolecules. In: Oates J. A., Hawiger J., Ross R. (eds): Interaction of Platelet with the vessel wall, p 1. Bethesda, MD, *Amer. Physiol. Society*.
- HAWIGER, J.; BRASS, L.F.; SALZMAN, E. W. (1994) Signal transduction and intracellular regulatory processes in platelets. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Terceira edição, editado por: Robert W. Colman, Jack Hirsh, Victor J. Marder and Edwin W. Salzman. *J. B. Lippincott Company, Philadelphia*, ch. 29, 603-627.

- HERBERT, J.M; HÉRALT, J.P; BERNAT, A.; VAN AMSTERDAN, R.G.M.; VOGEL, G.M.T; LORMEAU, J.C; PETITOU, M; MEULEMAN, DG. (1996) Biochemical and pharmacological properties of SANORG 32701. Comparison with the “synthetic pentasaccharide (SR90107/org 31549)” and standard heparin. *Circ. Res.* 79, 590-600.
- HERTZBERG, M. (1994) Biochemistry of factor X. *Blood Rev.* 8, 56-62.
- HO, S.J.; BRIGHTON, T.A. (2006). Ximelagatran: direct thrombin inhibitor. *Vasc. Heal. Risk Manag.* 2 (1), 49-58.
- HORAN, J.T.; FRANCIS, C.W. (2001) Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Thomb. Haemost.* 27, 657-666.
- HUNTINGTON, J.A. (2009) Slow thrombin is zymogen-like. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 159–164.
- HUNTINGTON, J.A.; BAGLIN, T.P. (2003) Targeting thrombin – rational drug design from natural mechanisms. *TRENDS Pharm. Scien.* 24, 589-596.
- ITALIANO, J.E.; BATTINELLI, E.M. (2009) Selective sorting of alpha-granule proteins. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 173–176.
- JACKSON, E.K.; RAGHVENDRA, D.K. (2004) The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 571-599.
- JACKSON, S.P. (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109, 5087-5095.
- JACKSON, S.P.; NESBITT, W.S.; WESTEIN, E. (2009) Dynamics of platelet thrombus formation. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 17-20.

- JARDÍN, I.; LÓPEZ, J.J.; PARIENTE, J.A.; SALIDO, G.M.; ROSADO, J.A. (2008) Intracellular calcium release from human platelets: different messengers for multiple stores. *Trends Cardiovasc. Med.* 18 (2), 57-61.
- KAHN, M.L.; NAKANISHI-MATSUI, M.; SHAPIRO, M.J.; ISHIHARA, H.; COUGHLIN, S.R. (1997) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* 103, 879-887.
- KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W.; BIGORNIA, V.; ZENG, D.; MOFF, S.; FARESE, R.V.JR.; TAM, C.; COUGHLIN, S.R. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394, 690-694.
- KALAFATIS, M.; RAND, M.D.; MANN, K.G. (1994a) Factor Va-membrane interaction is mediated by two regions located on the light chain of the cofactor. *Biochemistry* 33, 486-493.
- KALAFATIS, M.; SWORDS, N.A.; RAND, M.D.; MANN, K.G. (1994b) Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1227, 113-129.
- KALAFATIS, M.; XUE, J.; LAWLER, C.M.; MANN, K. G. (1994c) Contribution of the heavy and light chains of factor Va to the interaction with factor Xa. *Biochemistry* 33, 6538-6545.
- KAUFFENSTEIN, G; HECHLER, B.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. (2004) Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y<sub>12</sub> receptor. *J. Thromb. Haemost.* 2, 1980-1988.
- LEBLOND, L.; GROUX, B.; BOUDREAU, C.; YANG, Q.; SIDDIQUI, M.A.; WINOCOUR, P.D. (2000). In Vitro and in Vivo Properties of Bicyclic Lactam Inhibitors: A Novel Class of Low Molecular Weight Peptidomimetic Thrombin Inhibitors. *Thromb. Res.* 100, 195–209.
- LIAW, P.C.; FREDENBURGH, J.C.; STAFFORD, A.R.; TULINSKY, A.; AUSTIN, R. C.; WEITZ, J. I. (1998) Localization of the thrombin-binding domain on prothrombin fragment 2. *J. Biol. Chem.* 273, 8932-8939.

- LIMA, L.M.; FRATTANI, F.S.; DOS SANTOS, J.L.; CASTRO, H.C.; FRAGA, C.A.; ZINGALI, R.B.; BARREIRO, E.J. (2008) Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate--acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2), 348-356.
- LIU, L. W.; VU, T. K. H.; ESMON, C.T.; COUGHLIN, S.R. (1991a) The region of the thrombin receptor resembling hirudin binds to thrombin and alters enzyme specificity. *J. Biol. Chem.* 266, 16977-16980.
- LIU, L.W.; YE, J.; JOHNSON, A.E.; ESMON, C.T. (1991b) Proteolytic formation of either of the two prothrombin activation intermediates results in formation of a hirugen-binding site. *J. Biol. Chem.* 266, 23632-23636.
- LOSCALZO, J.; SCHAFFER, A.I. (2003) Overview of Hemostasis and Fibrinolysis. *New Therap. Ag. Thromb. and Thrombol.* 1, 01-08.
- MACKMAN, N. (2008) Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451 (7181), 914-918.
- MANN, K.G. (1999) Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. *Thromb. Haemost.* 82, 165-174.
- MANN, K.G.; VAN'T VEER, C.; CAWThERN, K.; BUTENAS, S. (1998) The role of tissue factor pathway in initiation of coagulation. *Blood. Coagul. Fibrinol.* 9, S3-S7.
- MAO, Y.; JIN, J.; KUNAPULI, S.P. (2008) Characterization of a new peptide agonist of the protease-activated receptor-1. *Biochem. Pharmacol.* 75 (2), 438-447.
- MARTINELLI, I. (2001). Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb. Haemost.* 86, 395-403.
- MARYANOFF, B.E.; ZHANG, H.C.; ANDRADE-GORDON, P.; DERIAN, C. K. (2003) Discovery of potent peptide-mimetic antagonists for the human thrombin receptor, protease-activated receptor-1 (PAR-1). *Curr. Med. Chem. Cardio. Hematol. Agents.* 1, 13-36.

- MATSUOKA, I.; OHKUBO, S. (2004) ATP and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid localized generation of adenosine by ecto-nucleotidases. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 95-99.
- MAZZUCATO, M.; COZZI, M. R.; PRADELLA, P.; RUGGERI, M.; DE MARCO, L. (2004) Distinct roles of ADP receptors in vonWillebrand factor-mediated platelet signaling and activation under high flow. *Blood* 104 (10), 3221-3227.
- MENDES-SILVA, W.; ASSAFIM, M.; RUTA, B.; MONTEIRO, R.Q.; GUIMARÃES, J.A.; ZINGALI, R.B. (2003) Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. *Thromb. Res.* 112 (1-2), 93-98.
- MOMI, S.; NASIMI, M.; COLUCCI, M.; NENCI, G.G.; GRESELE, P. (2001) Low molecular weight heparins prevent thrombin-induced thrombo-embolism in mice despite low anti-thrombin activity. Evidence that the inhibition of feedback activation of thrombin generation confers safety advantages over direct thrombin inhibition. *Haematologica.* 86 (3), 297-302.
- MONROE D.M.; HOFFMAN, M.; ROBERTS, H.R. (2002) Platelets and Thrombin Generation. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1381-1389.
- MONTEIRO, R.Q. (2001) Interação entre botrojaracina x protrombina: caracterização do sítio de ligação e efeito na ativação do zimogênio. Tese para obtenção do grau de Doutor, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.
- MONTEIRO, R. Q.; RAPOSO, J. G.; WISNER, A.; GUIMARÃES, J. A.; BON, C.; ZINGALI, R.B. (1999) Allosteric changes of thrombin catalytic site induced by interaction of bothrojaracin with anion-binding exosites I and II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 819-822.
- MORRISSEY, J.H.; MACIK, B.G.; NEUENSCHWANDER, P.F.; COMP, P.C. (1993) Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81, 734-744.

- MOSESSON, M.W. (1998) Fibrinogen structure and fibrin clot assembly. *Thromb. Hemost.* 24, 169-174.
- MURRAY, C.J.; LOPEZ A.D. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world; global burden of disease study. *Lancet.* 349, 1269-1276.
- MUSZBEK, L.; ADANY, R.; MIKKOLA, H. (1996) Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit. Ver. Clin. Lab. Sci.* 33, 357-421.
- NAKANISHI-MATSUI M.; ZHENG Y.; SULCINER D.J.; WEISS E. J.; LUDEMAN M.J.; COUGHLIN, S.R. (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404, 609-613.
- NANTERMET, P.G.; BARROW, J.C.; LUNDELL, G.F.; PELLICORE, J.M.; RITTLE, K.E.; YOUNG, M.; FREIDINGER, R.M.; CONNOLLY, T.M.; CONDRA, C.; KARCZEWSKI, J.; BEDNAR, R.A.; GAUL, S.L.; GOULD, R.J.; PRENDERGAST, K.; SELNICK, H.G. (2002) Discovery of a nonpeptidic small molecule antagonist of the human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 319-323.
- NEEDHAM L.; CUSACK N.J.; PEARSON J.D.; GORDON J.L. (1987) Characteristics of the P2 purinoceptor that mediates prostacyclin production by pig aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 134, 199-209.
- NGAI, P.N.; CHANG, J.Y. (1991) A novel one-step purification of human  $\alpha$ -thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched form plasma. *Biochem. J.* 280, 805-808.
- NIESWANDT, B.; VARGA-SZABO, D.; ELVERS, D. (2009) Integrins in platelet activation. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 206–209.
- NIESWANDT, B.; WATSON, S.P. (2003) Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449-461.

- NILSSON, T.; SJÖLING-ERICKSSON, A.; DEINUM, J. (1998) The mechanism of binding of low-molecular-weight active site inhibitors to human alpha-thrombin. *J. Enzyme Inhib.* 13 (1), 11-29.
- OFOU, F.A. (2003) Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelets to thrombin. *Transfus. Apheresis. Sci.* 28, 265-268.
- OFOU, F.A.; NYARKO, K.A. (2000) Human platelet thrombin receptors. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 14, 1185-1198.
- OFOU, F.A.; DEWAR, L.; CRAVEN, S.J.; SONG, Y.; CEDRONE, A.; FREEDMAN, J.; FENTON, J.W. (2008) Coordinate activation of human platelet protease-activated receptor-1 and -4 in response to subnanomolar alpha-thrombin. *J. Biol. Chem.* 283 (40), 26886-26893.
- OFOU, F.A.; DEWAR, L.; SONG, Y.; CEDRONE, A.C.; HORTELANO, G.; CRAVEN, S.J. (2009) Early intraplatelet signaling enhances the release of human platelet PAR-1 and -4 amino-terminal peptides in response to thrombin. *Biochemistry.* 48 (7), 1562-1572
- OSSOVSKAYA, V.S.; BUNNETT N.W. (2004) Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Americ. Physiol. Soc.* 84, 579–621.
- OFFERMANN, O. (2007) Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors. *Circ Res.* 99, 1293-1304.
- OZAKI, Y.; SUZUKI-INOUE, K.; INOUE, O. (2009) Novel interactions in platelet biology: CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 191–194.
- PATRONO, C.; COLLIER, B.; DALEN, J.E.; FITZGERALD, G.A.; FUSTER, V.; GENT, M.; HIRSH, J.; ROTH, G. (2001) Platelet active drugs. The relationship among dose, effectiveness and side effects. *Chest* 119, 39S-63S.
- PHILLIPS D.R.; CHARO I.F.; SCARBOROUGH R.M. (1991). GPIIb/IIIa: The responsive integrin. *Cell* 65, 359-362.

- POLANOWSKA-GRABOWSKA, R.; GIBBINS, J.M.; GEAR, A.R.L.. (2003) Platelet Adhesion to Collagen and Collagen-Related Peptide Under Flow Roles of the  $\alpha_2\beta_1$  Integrin, GPVI, and Src Tyrosine Kinases. *Arterios. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1934-1940.
- PRANDONI, P.; BERNARDI, E.; BAGATELLA, P.; PICCIOLI, A.; MARCHIORI, A. (2001) The optimal treatment of venous thrombosis: current status and future perspectives. *Clin. Lab.* 47 (3-4), 151-4.
- PRANDONI, P.; SIMIONI, P.; PAGNAN, A. (2003) Therapeutic indications for acute venous thromboembolism. Current status and future perspectives. *Min. Cardioangiol.* 51 (4), 361-371.
- PREVOST, N.; WOULFE, D.; TOGNOLINI, M.; BRASS, L.F. (2003) Contact-dependent signaling during the late events of platelet Activation. *J. Thromb. Haemost.* 1, 1613–1627.
- QUINSEY, N.S.; GREEDY, A.L.; BOTTOMLEY, S.P.; WHISSTOCK, J.C.; PIKE, R.N. (2004) Antithrombin: in control of coagulation. *Internat. J. Biochem. Cell Biology* 36, 386–389.
- REGAN, J.W.; NAKATA, H.; MARINIS, R.M. (1986) Purification and characterization of the human platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 261, 3894-3900.
- REIS, A.L.; ORMELLI, C.B.; MIRANDA, A.L.; FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J. (1999) Studies on antiplatelet agents from natural safrole. II. Synthesis and pharmacological properties of novel functionalized oxime O-benzylether derivatives. *Pharm. Acta Helv.* 74 (1), 19-28.
- RENNE´ , T.; OSCHATZ, C.; SEIFERT, S.; MU´ LLER, F.; ANTOVIC, J.; KARLMAN, M.; BENZ, P.M. (2009) Factor XI deficiency in animal models. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 79–83.
- REZAIIE, A.R. (2003) Exosite-Dependent Regulation of the Protein C Anticoagulant Pathway. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 8-15.

- RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J.A. (1995) Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 308, 243 - 249.
- ROSADO, J.A.; SAGE, S.O. (2002) The ERK cascade, a new pathway involved in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc. Med.* 12 (5), 229-234.
- ROSENBERG, R.D. (2001) Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states: Clinical utility of activation peptide assays in predicting thrombotic events in different clinical populations. *Thromb. Haemost.* 86, 41-50.
- RUGGERI, Z.M. (1997) Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemost.* 78, 611-616.
- RUGGERI, Z.M. (2007) The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb. Res.* 120, S5-S9.
- SACHS, U.J.H.; NIESWANDT, B. (2007) In Vivo Thrombus Formation in Murine Models. *Circ. Res.* 100, 979-991.
- SAKURAI, Y.; MIDORI, S.; GIDDINGS, J.; TAKEYAMA, M.; KASUDA, S.; NOGAMI, K.; NISHIYA, K.; YOSHIOKA, A. (2004) A critical role for thrombin in platelet aggregation under high shear stress. *Thromb. Res.* 113, 311-318.
- SAUSSY, D.L.; MAIS, D.E.; BURCH, R.M.; HALUSHKA, P.V. (1986) Identification of a putative thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor in human platelet membranes. *J. Biol. Chem.* 261, 3025-3029.
- SCHNEIDER, D. J.; SOBEL, B.E. (2008) Conundrums in the Combined Use of Anticoagulants and Antiplatelet Drugs. *Circulation* 116, 305-315.

- SHAPIRO, M.J.; WEISS, E.J.; FARUQI, T.R.; COUGHLIN, S.R. (2000) Protease-activated Receptors 1 and 4 Are Shut Off with Distinct Kinetics after Activation by Thrombin. *J. Biolog. Chemist.* 275, 25216–25221.
- SHEEHAN, J.P.; SADLER, J.E. (1994) Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5518-5522.
- SIMMONDS, R.E.; HERMIDA, J.; REZENDE, S.M.; LANE, D.A. (2001) Haemostatic genetic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* 86, 374-383.
- SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and 2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157-33160.
- SOLUM, N.O. (1999) Procoagulant Expression in Platelets and Defects Leading to Clinical Disorders. *Arterios. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2841-2846.
- SOSLAU, G.; ANDO, A.; FLOYD, L.; HONG, T.; MATHEW, L.; YEN, Y. (2008) Effect of low and high dose melagatran and other antithrombotic drugs on platelet aggregation. *J. Thromb. Thrombolysis* 25 (2), 198-203.
- SOSLAU, G.; CLASS, R.; MORGAN, D.A.; FOSTER, C.; LORD, S.T.; MARCHESE, P.; RUGGERI, Z.M. (2001) Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein-Ib. *J. Biol. Chem.*; 276, 21173-21183.
- SPRONK, H.; VAN DER VOORT, D.; CATE, H. (2004) Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thromb. J.* 2 (1), 12.
- SITGES, M.; BOSCH, X.; SANZ, G. (2000) The efficacy of platelet IIb/IIIa receptor blockers in acute coronary syndromes. *Rev. Esp. Cardiol.* 53 (3), 422-439.
- STUBBS, M. T.; BODE, W. (1993) A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 69, 1-58.
- SUZUKI, K.; DÄHLBACK, B.; STENFLO, J. (1982) Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J. Biol. Chem.* 257, 6556-6564.

- TANDON, N.N.; KRALISZ, U.; JAMIESON, G.A. (1989) Identification of GPIV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 264, 7576-7583.
- TANIMURA, A.; SHITARA, A.; NEZU, A.; MORITA, T.; TOJYO, Y. (2003) Differential Ca(2+) responses induced by thrombin and thrombin-receptor agonist peptides in HSY-EA1 cells. *Cell Biol. Int.* 27,1017-1023.
- UBATUBA, F.B. (1989) An animal model for the study of arterial thrombosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 993-1000.
- VAN GEET, C.; IZZI, B.; LABARQUE, V.; FRESON, K. (2009) Human platelet pathology related to defects in the G-protein signaling cascade. *J. Thromb. Haem.* 7 (sup. 1), 282–286.
- VAN ZYL, W.B.; PRETORIUS, G.H.; LAMPRECHT, S.; ROODT, J.P.; KOTZE, H.F. (2000). PLATSAK, a potent antithrombotic and fibrinolytic protein, inhibits arterial and venous thrombosis in a baboon model. *Thromb. Res.* 98, 435-443.
- VANE, J.R.; BOTTING R.M. (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb. Res.* 110, 255–258.
- VARGA-SZABO D., BRAUN A.; NIESWANDT B. (2009) Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 7 (7),1057-1066.
- WATSON, S.P.; GIBBINS J. (1998) Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol. Today* 19, 260-264.
- WATSON, S.P. (1999) Collagen receptors signaling in platelets and megakaryocytes. *Thromb. Haemost.* 82, 365-376.
- WEITZ, J.I.; HIRSH, J. (2001) New anticoagulant drugs. *Chest* 119, 95S-107S.

- WONG, P.C.; CRAIN, E. J.; WATSON, C. A.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S.; QUAN, M. L.; KNABB, R. M. (2007) Razaxaban, a direct factor Xa inhibitor, in combination with aspirin and/or clopidogrel improves low-dose antithrombotic activity without enhancing bleeding liability in rabbits. *J. Thromb. Thrombol.* 24, 43–51.
- WRIGHT, I.S. (1962) The nomenclature of blood clotting factors. *Thromb. Diath. Haemost.* 7, 381-388.
- WU, C.C.; HUANG, S.W.; HWANG, T.L.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; TENG, C.M. (2000) YD-3, a novel inhibitor of protease-induced platelet activation. *Br. J. Pharmacol.* 130 (6), 1289-1296.
- WU, C.C.; HWANG, T.L.; LIAO, C.H.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; LEE, C.Y.; TENG, C.M. (2002) Selective inhibition of protease-activated receptor 4-dependent platelet activation by YD-3. *Thromb. Haemost.* 87 (6), 1026-1033.
- YE, J.; ESMON, N.L.; ESMON, C.T.; JOHNSON, A.E. (1991) The active site of thrombin is altered upon binding to thrombomodulin. *J. Biol. Chem.* 266, 23016-23021.
- YE, J.; LIU, L. W.; ESMON, C. T.; JOHNSON, A. E. (1992) The fifth and sixth epidermal growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity. *J. Biol. Chem.* 267, 11023-11028.
- YOSHIOKA, A.; YOSHIHIKO, S.; MIDORI, S.; GIDDINGS, J.; MASAHIRO, T.; KASUDA, S.; NOGAMI, K.; NISHIYA, K. (2004) A critical role for thrombin in platelet aggregation under high shear stress. *Thromb. Res.* 113, 311-318.
- ZANCAN, P.; MOUÃO, P. A. S. (2004) Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 15 (1), 45-54.
- ZAVALOVA, L.L.; BASANOVA, A.V.; BASKOVA, I.P. (2002) Fibrinogen-fibrin system regulators from bloodsuckers. *Biochemistry (Mosc.)*, 67, 135-142.



Original article

## Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate–acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates

Lídia M. Lima<sup>a,\*</sup>, Flávia S. Frattani<sup>b</sup>, Jean L. dos Santos<sup>a</sup>, Helena C. Castro<sup>b,1</sup>,  
Carlos Alberto M. Fraga<sup>a</sup>, Russolina B. Zingali<sup>b</sup>, Eliezer J. Barreiro<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, PO Box 68006, 21944-910, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Programa de Biologia Estrutural,  
Instituto de Bioquímica Médica UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 25 January 2007; received in revised form 26 March 2007; accepted 28 March 2007  
Available online 14 April 2007

### Abstract

In this work, we describe a new class of promising anti-platelet drug candidates with significant antithrombotic activity *in vivo*. This new series of compounds was structurally planned by modification of known thrombin inhibitors based on the use of acylhydrazone subunit, as a non-peptide scaffold, and variations at P1 moiety. Three different families of arylsulfonate–acylhydrazone derivatives were designed. The bioassays indicated the first class of derivatives represented by **4f** (LASSBio-693) and **4j** (LASSBio-743), which were active in inhibiting the platelet aggregation induced by thrombin. The second class represented by compounds **4e** (LASSBio-774) and **4h** (LASSBio-480) that selectively inhibit the platelet aggregation involving TXA<sub>2</sub> formation. Finally, the third class of derivatives was identified acting as a novel symbiotic agent able to inhibit the platelet aggregation induced by collagen or AA and by thrombin, represented by compounds **4b** (LASSBio-694) and **4g** (LASSBio-770).

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Anti-platelet activity; *N*-Acylhydrazone (NAH); Thrombin

### 1. Introduction

Thromboembolic disorders are the major cause of morbidity and mortality in Western societies. Clinical regulation of thrombosis involves the anti-platelet therapy (e.g. acetylsalicylic acid), thrombolytic agents (e.g. streptokinase), and drugs that affect the activity and generation of thrombin (e.g. heparin, argatroban) [1–3].

Thrombin is a multifunctional serine protease that plays a central role in thrombosis and hemostasis, not only by

enzymatic activation of coagulation factors, but also by direct stimulation of several cell types such as platelets [4,5].

Platelets are also involved in the thrombotic pathologies. They play a major role in vascular occlusive diseases such as angina, myocardial infarction, and stroke, as a consequence of their inappropriate and sustained activation, being thus considered also important targets for antithrombotic drugs [6]. Inhibitors of thrombin have long been recognized as potential therapeutic agents for the treatment of a variety of thrombotic disorders [7]. In fact, intravenous (e.g. argatroban) and oral (e.g. ximelagatran) chiral thrombin inhibitors have shown promising results in human clinical trials [7,8]. It was often observed that thrombin inhibitors with strongly basic P1 moieties have low selectivity against other serine proteases and poor oral bioavailability. Therefore, derivatives bearing P1 elements with modulated basicity (between pKa 6.5 and 9.0) may be considered more promising lead-compounds [9].

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. Tel./fax: +55 21 25626644.

E-mail addresses: [lidia@pharma.ufrj.br](mailto:lidia@pharma.ufrj.br) (L.M. Lima), [ejbarreiro@ccsdecania.ufrj.br](mailto:ejbarreiro@ccsdecania.ufrj.br) (E.J. Barreiro).

<sup>1</sup> Present address. Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABioMol), Instituto de Biologia, UFF, R.J., Brazil.

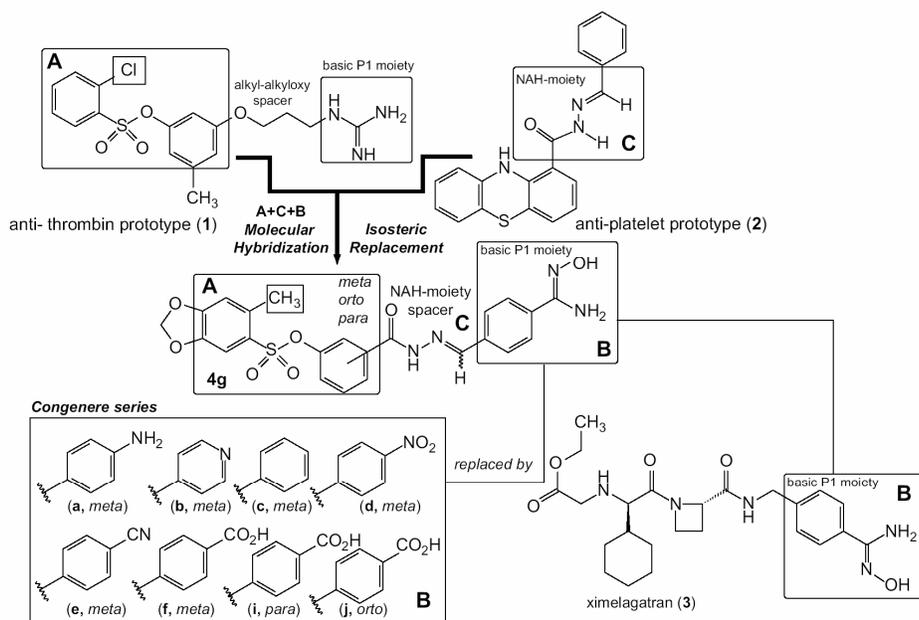
In this paper, we report the design, synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate–acylhydrazone derivatives (**4a–j**). These compounds were planned by applying molecular hybridization strategy on classical thrombin inhibitors (**1**) [11] and on anti-platelet *N*-acylhydrazone (NAH) compound (**2**) [12], elected as prototypes (Scheme 1). The main structural features of the new arylsulfonate–acylhydrazone derivatives (**4a–j**) were based on classic isosteric replacement [20] of chlorine atom, of the structure of anti-thrombin prototype (**1**), by methyl group and the introduction of the NAH moiety instead of the alkyl–alkoxy subunit present in **1**. Otherwise, considering the aza–vinylogue relationship of NAH group with the amide present in the structures of ximelagatran (**3**), it seems reasonable to introduce the NAH moiety as a spacer between the subunits arylsulfonate (**A**) and *N*-hydroxy benzamidine (**B**) (Scheme 1). Finally, variations at terminal basic *N*-hydroxy-benzamidine subunit **B** by groups like aniline and pyridine were done in order to obtain compounds bearing P1 moiety with modulated basicity. Otherwise, the chemical nature of the subunit **B** can also be modified aiming to investigate the contribution of neutral and acid groups in the activity of this new series of compounds, designed as antithrombotic candidates.

## 2. Chemistry and biological activity testing

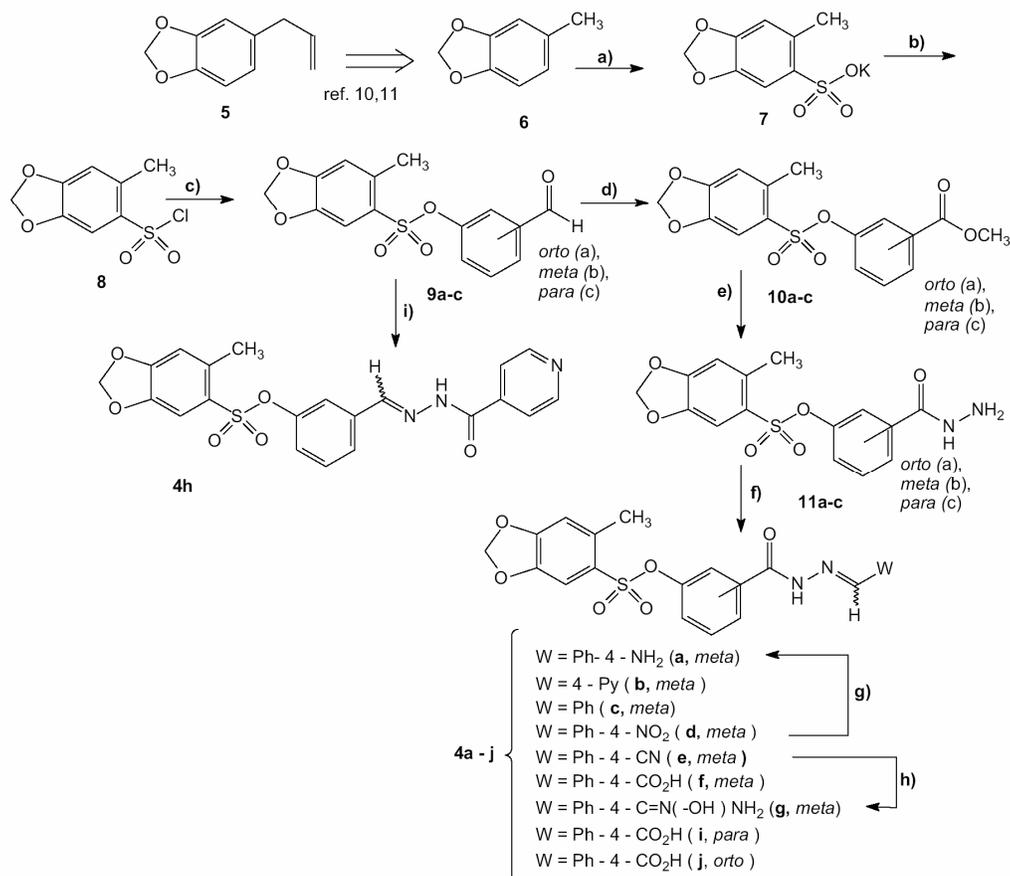
The target derivatives (**4a–j**) were synthesized as depicted in Scheme 2. In the synthetic approach compound 2-methyl-4,5-methylenedioxy-phenyl-sulfonyl chloride (**8**) was identified as the key precursor. This compound can be obtained by

regioselective aromatic electrophilic substitution at the C-6 position of 3,4-methylenedioxytoluene (**6**), which was obtained in ca. 50% overall yield from natural safrole (**5**), an abundant natural product [12,13]. As previously described [10], simple distillation of sassafras oil generates **5** in 85% yield. Basic catalyzed isomerization of the double bond followed by oxidative cleavage and Wolff–Kishner reduction gave **6** in appropriated yield. The arylsulfonyl chloride derivative (**8**) was next prepared in two steps from **6**, applying an efficient and mild sulfonation of 1,3-benzodioxole derivative **6** followed by the treatment of the potassium salt (**7**) with thionyl chloride, catalyzed by the Vilsmeier–Haack complex, to afford derivative **8** in 74% yield [13].

With an attractive method for access to the key intermediate (**8**), we next performed the condensation of this compound with phenols (e.g. 3-hydroxybenzaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde and 2-hydroxybenzaldehyde) in chloroform at room temperature, in the presence of triethylamine, to afford the corresponding arylsulfonate–aldehyde derivatives **9a–c** in 81–98% yield. The synthesis of NAH-derivatives (**4b–f**, **4i**, **4j**) was carried out by exploring successive classical functional groups interconversions on compounds **9a–c**. Thus, the treatment of **9a–c** with sodium cyanide and manganese oxide in methanol at room temperature [14] furnished the ester intermediates (**10a–c**) in 60–97% yield. The hydrazinolysis of the methyl esters (**10a–c**) furnished the corresponding hydrazone derivatives (**11a–c**) in 75–81% yield. Condensation of **11a–c** with the appropriate aromatic aldehydes yielded the new series of sulfonate–acylhydrazone derivatives (**4b–f**, **4i**, **4j**) in excellent yield. Analysis of the <sup>1</sup>H NMR spectra of the new



Scheme 1.



Scheme 2. Conditions: (a) (1) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ac<sub>2</sub>O, AcOEt, 0 °C, r.t., 2 h, (2) AcOK, EtOH, r.t., 30 min, 91%; (b) SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMF cat, reflux, 4 h, 74%; (c) 3-hydroxybenzaldehyde (or 2-hydroxybenzaldehyde or 4-hydroxybenzaldehyde), Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 2 h, 81–98%; (d) MnO<sub>2</sub>, NaCN, MeOH, r.t., 24 h, 60–97%; (e) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, EtOH, r.t., 2 h, 75–81%; (f) ArCHO, EtOH, HCl cat, reflux, 1 h, 84–98%; (g) Fe, NH<sub>2</sub>Cl, EtOH/H<sub>2</sub>O (2:1), reflux, 30 min, 75%; (h) NH<sub>2</sub>OH·HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, H<sub>2</sub>O, reflux, 8 h, 69%; (i) isoniazide, EtOH, HCl cat, r.t., 30 min, 78%.

derivatives **4b–f** and **4i, 4j** showed the presence of a single signal referring to ylidic hydrogen, attributed to the *E*-diastereomer in agreement with the previous report [15]. Finally, compounds **4a** and **4g** were prepared by interconversion of nitro and nitrile groups, respectively, as follow. Compound **4a** was prepared by reduction of derivative **4d** in the presence of iron powder and ammonium chloride in a mixture of ethanol and water [16], while compound **4g** was synthesized by the treatment with hydroxylamine in ethanol at reflux in 69% yield [17]. Finally, compound **4h** was prepared in good yield by condensation of hydrazide **9a** with isoniazide, using hydrochloric acid as catalyst. The analysis of the <sup>1</sup>H NMR spectra of the hydrazone derivative **4h** showed the presence of two ylidic hydrogen signals at δ 7.9 and 8.5 attributed to the *Z*- and *E*-diastereomers (1:4), respectively.

The *in vitro* anti-platelet activity of these novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives (**4a–j**, 150 μM) was evaluated by their ability to inhibit platelet aggregation of rabbit platelet-

rich plasma (PRP) [18] induced by thrombin (2 nM), ADP (5 μM), collagen suspension (5 μg.mL<sup>-1</sup>) and arachidonic acid (AA) (100 μM), using acetylsalicylic acid (AAS, 150 μM) as a positive control.

### 3. Results and discussion

The primary screening data for all compounds (150 μM) are shown in Table 1. The results, displayed in Table 1, demonstrate that compounds **4b** (LASSBio-694) and **4g** (LASSBio-770) having a basic P1 subunit (pyridine and *N*-hydroxybenzamidine, respectively) were able to inhibit the platelet aggregation induced by thrombin in 72.5% and 81%, respectively, while compound **4a** (LASSBio-751), having aminophenyl P1 subunit, was inactive. Nevertheless, the anti-platelet activity found for these compounds, when the platelets were induced either by AA or collagen, indicates that **4b** and **4g** could have dual mechanism of action. In fact, its known

Table 1  
Effect of sulfonate-acylhydrazone derivatives (**4a–j**) on in vitro platelet aggregation of citrated rabbit platelet-rich plasma induced by thrombin, arachidonic acid, ADP and collagen

Compound	Concentration (μM)	Thrombin (2 nM)		Arachidonic acid (100 μM)		ADP (5 μM)		Collagen (5 μg/mL)		n
		Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)	
Control	4	59.5 ± 1.3		76.0 ± 1.4		81.2 ± 4.9		78.7 ± 3.2		4
AAS	3	10.3 ± 6.4	82.7*	21.6 ± 4.5	71.6*	74.8 ± 0.2		17.5 ± 12.3	77.7*	3
<b>4a</b> (LASSBio-751)	150	58.2 ± 2.2	2.2	15.2 ± 2.0	80*	100 ± 0.0		49.2 ± 3.2	37.5*	3
<b>4b</b> (LASSBio-694)	150	16.4 ± 5.2	72.5*	13.7 ± 3.5	82*	100 ± 0.0		59.0 ± 0.2	25	3
<b>4c</b> (LASSBio-744)	150	100 ± 0.0	0	2.2 ± 2.8	97*	100 ± 0.0		45.6 ± 6.3	42*	3
<b>4d</b> (LASSBio-750)	150	57.7 ± 2.2	3	14.1 ± 3.1	81.5*	100 ± 0.0		69.6 ± 3.5	11.5	3
<b>4e</b> (LASSBio-774)	150	58.3 ± 2.0	2	0.0 ± 0.0	100*	54.9 ± 0.3		0.0 ± 0.0	100*	3
<b>4f</b> (LASSBio-693)	150	2.9 ± 3.0	95*	100 ± 0.0	0	100 ± 0.0		100 ± 0.0	0	3
<b>4g</b> (LASSBio-770)	150	11.3 ± 0.58	81*	0.0 ± 0.0	100*	58.7 ± 7.9		0.0 ± 0.0	100*	3
<b>4h</b> (LASSBio-480)	150	58.7 ± 1.3	1.3	4.0 ± 1.6	94.8*	63.3 ± 6.9		0.0 ± 0.0	100*	3
<b>4i</b> (LASSBio-752)	150	0.0 ± 0.0	100*	6.9 ± 4.1	90.8*	100 ± 0.0		59.0 ± 4.0	25	3
<b>4j</b> (LASSBio-743)	150	11.9 ± 3.5	80*	100 ± 0.0	0	100 ± 0.0		100 ± 0.0	0	3

n = Number of independent experiments carried out in triplicate; \*p < 0.05 compared to appropriate control (Student's t test).

that in rabbit PRP, the collagen and AA induced aggregation is mediated by thromboxane (TXA<sub>2</sub>) formation [19]. Intriguing, the evaluation of the retroisoster [20] of compound **4b**, derivative **4h** (LASSBio-480), revealed loss of activity upon thrombin induced platelet aggregation and potentiated the anti-platelet activity mediated by AA or collagen. As anticipated, none of the derivatives having a neutral PI subunit was active in inhibiting the aggregation induced by thrombin. However, compounds **4c** (LASSBio-744), **4d** (LASSBio-750) and **4e** (LASSBio-774) effectively inhibited the platelet aggregation induced by AA and collagen, indicating a distinct profile when compared to **4b** and **4g** (Table 1). Curiously, derivative **4f** (LASSBio-693), having an acidic PI subunit, showed a great selectivity and activity on inhibition of platelet aggregation induced by thrombin (95% inhibition). With these results in hands, the regioisomers of compound **4f** (*meta*-isomer), i.e., derivatives **4i** (*para*-isomer) and **4j** (*ortho*-isomer), were synthesized and evaluated with the same bioassay (Table 1). As showed in Table 1, the replacement of *N*-acylhydrazone moiety at the position 3 (*meta*, **4f**) either to the position 4 (*para*, **4i**) or the position 2 (*ortho*, **4j**) results in activity on thrombin level, although the compound **4j** loses the selectivity. These results indicated that geometric modifications, exploring the space relationship between the NAH and sulfonate subunits, can address the activity on different physiological agonists of platelet aggregation process. Otherwise, electronical parameters also seem to be important and only compounds bearing basic or acid groups at the PI subunit were able to prevent platelet aggregation induced by thrombin.

Molecular modeling studies were carried out using SYBYL molecular mechanics in order to establish the conformer distribution in compounds **4f** (LASSBio-693), **4i** (LASSBio-752) and **4j** (LASSBio-743). Then, the global minimum conformer of **4f**, **4i** and **4j** were selected to perform the equilibrium geometry using the semiempirical AM1 Hamiltonian (Table 2) [21].

The results from conformational analysis of derivatives **4f**, **4i** and **4j** provided a rational for the differences found in the pharmacological profile of *ortho*-isomer **4j**, when compared to *meta*-**4f** and *para*-isomers **4i** (Table 2). As shown in Table 2, these regioisomers also differ in their molecular shape, area and volume, having distinct polarity. Compounds **4f** and **4i** are more similar in this series.

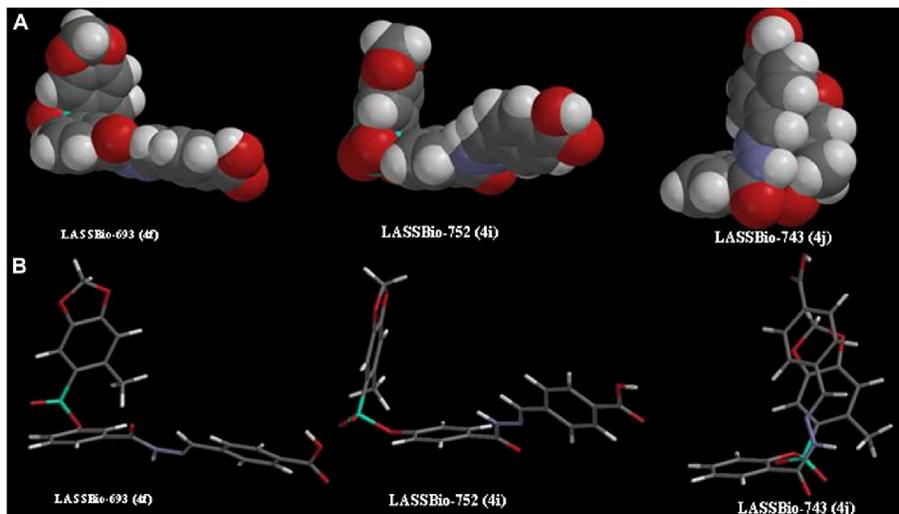
More attractive compounds **4b**, **4f**, **4i** and **4j** were selected to evaluate their antithrombotic effects in a pulmonary thromboembolism model induced by thrombin in mouse [23]. As shown in Table 3, all compounds were able to increase the survival rate when given orally at a dose of 100 μmol/kg.

#### 4. Conclusions

In summary, we demonstrated that the novel series of arylsulfonate-acylhydrazone derivatives (**4a–j**) represent a promising anti-platelet lead-candidate with significant antithrombotic activity in vivo. Structural modifications at PI subunit exploring neutral, acid or basic groups can address the activity on the platelet, resulting in compounds that are more or less selective on thrombin levels. Otherwise, the results from the bioassays

Table 2

Minimum energy conformer of arylsulfonate–acylhydrazone derivatives (**4f**, **4i** and **4j**). (A) Space-filling (CPK) model for compounds **4f**, **4i** and **4j**; (B) tube model for compounds **4f**, **4i** and **4j**



Compound	$\Delta H_f$ (kcal/mol)	Diastereomer	Conformer	Area ( $\text{\AA}^2$ )	Volume ( $\text{\AA}^3$ )	Dipole (debye)
<b>4f</b>	-169.23	<i>E</i>	<i>S-cis</i>	494.02	488.74	7.012
<b>4i</b>	-169.55	<i>E</i>	<i>S-trans</i>	498.20	489.81	9.121
<b>4j</b>	-163.71	<i>E</i>	<i>S-cis</i>	490.28	488.01	4.648

identify a new class of derivatives, the first class, represented by compounds **4f** and **4j**, which were active in inhibiting the platelet aggregation induced by thrombin, the second class of derivatives, represented by compounds **4e** and **4h**, that inhibit the platelet aggregation involving  $\text{TXA}_2$  formation and finally the third class of derivatives acting as a novel symbiotic candidates, able to inhibit simultaneously the platelet aggregation induced by collagen or AA and by thrombin, represented by compounds **4b** and **4g**.

## 5. Experimental

Melting points were determined with a Quimis 340 apparatus and are uncorrected.  $^1\text{H}$  NMR spectra, unless otherwise stated, were obtained in deuterated dimethylsulfoxide or deuterated chloroform containing ca. 1% tetramethylsilane as an internal standard using a Bruker AC 200 spectrometer at 200 MHz. Splitting patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; dt, double triplet; br, broad; m, multiplet.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were obtained using the same spectrometer described above at 50 MHz, using deuterated dimethylsulfoxide as internal standard. IR spectra were obtained using Bruker IFS66 spectrophotometer employing potassium bromide plates. Microanalysis data were obtained using a Perkin-Elmer 240 analyser, using a Perkin-Elmer AD-4 balance. The progress of all reactions was monitored by TLC

performed on  $2.0 \times 6.0$  cm aluminium sheets precoated with silica gel 60 (HF-254, E. Merck) to a thickness of 0.25 mm. The developed chromatograms were viewed under ultraviolet light at 254 nm. E. Merck silica gel (60–200 mesh) was used for column chromatography.

### 5.1. Anti-platelet activity

Blood was withdrawn from rabbit ear central artery and mixed with 3.8% trisodium citrate (9:1 v/v). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation at  $375 \times g$  for 10 min at room temperature. The platelet-poor plasma (PPP) was prepared by centrifugation of the pellet at  $1800 \times g$  for 10 min at room temperature. Platelet aggregation was monitored by the turbidimetric method of Born and Cross [18] using a Chrono-Log aggregometer. PRP (300  $\mu\text{L}$ ) was incubated

Table 3  
Antithrombotic effect of compounds (**4b**, **4f**, **4j** and **4i**) in a pulmonary thromboembolism model induced by thrombin in mouse

Compound	Dose (p.o.) $\mu\text{mol/kg}$ (0.1 mL/20 g)	Survive (%)
Control	—	$16.67 \pm 3.33$
<b>4b</b> (LASSBio-694)	100	$33.33 \pm 6.67$
<b>4f</b> (LASSBio-693)	100	$53.33 \pm 6.67$
<b>4j</b> (LASSBio-743)	100	$80.00 \pm 11.5$
<b>4i</b> (LASSBio-752)	100	$80.00 \pm 1.00$

at 37 °C for 1 min with continuous stirring at 900 rpm. Platelet aggregation was induced by ADP (5 μM), collagen suspension (5 μg.mL<sup>-1</sup>), thrombin (2 nM) or arachidonic acid (AA, 100 μM). Compound (150 μM) or vehicle DMSO (0.5% v/v) was added to the PRP samples 1 min before addition of the aggregating agent. Acetylsalicylic acid (AAS, 150 μM), a classical PGHS inhibitor, was used as positive control.

## 5.2. Pulmonary thromboembolism model induced by thrombin in mouse [23]

Arylsulfonate–acylhydrazones derivatives (**4b**, **4f**, **4j** and **4i**) were given orally (100 μmol/kg; 0.1 mL/20 g) as a suspension in 5% arabic gum in saline (vehicle), 60 min before i.v. injection of the thrombogenic stimulus. Thrombotic event was induced by human thrombin (2000 UI/kg animal) and the survival rate was evaluated 15 min after thrombotic event. Results shown represent the mean ± SD of three groups of five animals each.

## 5.3. General procedure for the preparation of 6-methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid-formyl-phenyl ester derivatives (**9a–c**)

To a solution of 1.45 mmol of sulfonyl chloride derivative (**8**) in 10 mL of methylene chloride, were added 1.45 mmol of the appropriate hydroxybenzaldehydes and 1.54 mmol of triethylamine. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature, when the end of reaction was observed by TLC. The products (**9a–c**) were isolated by addition of 40 mL of methylene chloride and extraction with 10% aq. HCl (4 × 20 mL) and brine (3 × 20 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure to furnish the aldehyde derivatives (**9a–c**) in excellent yields.

### 5.3.1. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-formyl-phenyl ester (**9a**)

Derivative **9a** was obtained as brown solid in 98% yield, mp 65–66 °C. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.68 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.04 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.83 (s, H<sub>2</sub>); 7.22 (s, H<sub>5</sub>); 7.33–7.35 (m, H<sub>5'</sub>); 7.47–7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.50 (s, H<sub>2'</sub>); 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, H<sub>4'</sub>), 9.94 (s, ArCOH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.69 (ArCH<sub>3</sub>); 102.64 (OCH<sub>2</sub>O); 110.49 (C<sub>5</sub>); 112.38 (C<sub>2</sub>); 122.77 (C<sub>2'</sub>); 126.08 (C<sub>3'</sub>); 128.29 (C<sub>6'</sub>); 128.50 (C<sub>5'</sub>); 130.64 (C<sub>4'</sub>); 135.46 (C<sub>1</sub>); 138.03 (C<sub>6</sub>); 146.04 (C<sub>4</sub>); 150.21 (C<sub>1'</sub>); 152.68 (C<sub>3</sub>); 190.75 (ArCOH) ppm.

### 5.3.2. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 4-formyl-phenyl ester (**9b**)

Derivative **9b** was obtained as yellow solid in 89% yield, mp 104–106 °C. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.58 (s, ArCH<sub>3</sub>); 5.95 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.73 (s, H<sub>2</sub>); 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, H<sub>2'</sub> and H<sub>6'</sub>); 7.15 (s, H<sub>5</sub>); 7.75 (d, *J* = 8.6 Hz, H<sub>3'</sub> and H<sub>5'</sub>); 9.87 (s, ArCOH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.71 (ArCH<sub>3</sub>); 102.70 (OCH<sub>2</sub>O); 110.55 (C<sub>5</sub>); 112.40 (C<sub>2</sub>);

122.93 (C<sub>2'</sub> and C<sub>6'</sub>); 126.27 (C<sub>4'</sub>); 131.50 (C<sub>3'</sub> and C<sub>5'</sub>); 134.97 (C<sub>1</sub>); 135.53 (C<sub>6</sub>); 146.11 (C<sub>4</sub>); 152.77 (C<sub>3</sub>); 154.01 (C<sub>1'</sub>); 190.78 (ArCOH) ppm.

### 5.3.3. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 2-formyl-phenyl ester (**9c**)

Derivative **9c** was obtained as brown solid in 81% yield, mp 98–100 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.66 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.09 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.85 (s, H<sub>2</sub>); 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.29 (s, H<sub>5</sub>); 7.30 (dt, *J* = 7.1 Hz and 8.1 Hz, H<sub>5'</sub>); 7.58 (dt, *J* = 7.1 Hz and 7.7 Hz, H<sub>4'</sub>); 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, H<sub>3'</sub>); 10.20 (s, ArCOH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.80 (ArCH<sub>3</sub>); 102.70 (OCH<sub>2</sub>O); 110.40 (C<sub>5</sub>); 112.60 (C<sub>2</sub>); 123.48 (C<sub>6'</sub>); 125.78 (C<sub>2'</sub>); 127.67 (C<sub>1</sub>); 128.89 (C<sub>4'</sub>); 129.74 (C<sub>3'</sub>); 135.46 (C<sub>5'</sub>); 135.78 (C<sub>6</sub>); 146.24 (C<sub>4</sub>); 151.38 (C<sub>1'</sub>); 152.98 (C<sub>3</sub>); 187.85 (ArCOH) ppm.

## 5.4. General procedure for the preparation of (6-methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonyloxy)-benzoic acid methyl ester derivatives (**10a–c**)

To a mixture of 0.81 mmol of aldehyde derivatives (**9a–c**) in methanol (30 mL) was added 4.1 mmol of sodium cyanide and 12.2 mmol of activated manganese dioxide. The reactants were stirred at room temperature for 24 h and the suspension was filtered through Celite<sup>®</sup> and treated with dichloromethane (3 × 30 mL) and water (100 mL). The organic layers were joined, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure to furnish methyl esters **10a–c** in good yields.

### 5.4.1. 3-(6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonyloxy)-benzoic acid methyl ester (**10a**)

Derivative **10a** was obtained as yellow solid in 97% yield, mp 178–180 °C. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.58 (s, ArCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5.94 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.73 (s, H<sub>2</sub>); 7.14 (s, H<sub>5</sub>); 7.15 (d, *J* = 8.1 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.29 (dt, *J* = 8.1 Hz and 7.8 Hz, H<sub>5'</sub>); 7.58 (s, H<sub>2'</sub>); 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, H<sub>4'</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.74 (ArCH<sub>3</sub>); 52.56 (s, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 102.60 (OCH<sub>2</sub>O); 110.63 (C<sub>5</sub>); 112.35 (C<sub>2</sub>); 123.46 (C<sub>2'</sub>); 126.38 (C<sub>6'</sub>); 126.79 (C<sub>5'</sub>); 128.32 (C<sub>4'</sub>); 129.89 (C<sub>3'</sub>); 132.18 (C<sub>1</sub>); 135.48 (C<sub>6</sub>); 146.04 (C<sub>4</sub>); 149.64 (C<sub>1'</sub>); 152.61 (C<sub>3</sub>); 165.83 (ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

### 5.4.2. 4-(6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonyloxy)benzoic acid methyl ester (**10b**)

Derivative **10b** was obtained as yellow solid in 80% yield, mp 99–101 °C. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.66 (s, ArCH<sub>3</sub>); 3.88 (s, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 6.04 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.80 (s, H<sub>2</sub>); 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, H<sub>2'</sub> and H<sub>6'</sub>); 7.22 (s, H<sub>5</sub>); 7.99 (d, *J* = 8.6 Hz, H<sub>3'</sub> and H<sub>5'</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.70 (ArCH<sub>3</sub>); 52.48 (ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 102.64 (OCH<sub>2</sub>O); 110.60 (C<sub>5</sub>); 112.32 (C<sub>2</sub>); 122.18 (C<sub>2'</sub> and C<sub>6'</sub>); 126.29 (C<sub>4'</sub>); 129.04 (C<sub>1</sub>); 131.52 (C<sub>3'</sub> and C<sub>5'</sub>); 135.45 (C<sub>6</sub>); 146.04 (C<sub>4</sub>); 152.65 (C<sub>3</sub>); 153.06 (C<sub>1'</sub>); 166.11 (ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 5.4.3. 2-(6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonyloxy)benzoic acid methyl ester (**10c**)

Derivative **10c** was obtained as yellow solid in 60% yield, mp 106–108 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.64 (s, ArCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 6.04 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.81 (s, H<sub>2</sub>); 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.21 (s, H<sub>5</sub>); 7.32 (dt, *J* = 6.3 Hz and 7.6 Hz, H<sub>4'</sub>); 7.34 (dt, *J* = 8.1 Hz and 6.3 Hz, H<sub>5'</sub>); 7.89 (d, *J* = 7.6 Hz, H<sub>3'</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.84 (ArCH<sub>3</sub>); 52.59 (s, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 102.56 (OCH<sub>2</sub>O); 110.40 (C<sub>5</sub>); 112.31 (C<sub>2</sub>); 123.57 (C<sub>6'</sub>); 126.07 (C<sub>2'</sub>); 127.17 (C<sub>1</sub>); 127.17 (C<sub>4'</sub>); 132.12 (C<sub>3'</sub>); 133.34 (C<sub>5'</sub>); 135.60 (C<sub>6</sub>); 145.91 (C<sub>4</sub>); 147.97 (C<sub>1'</sub>); 152.43 (C<sub>3</sub>); 165.46 (ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 5.5. General procedure for the preparation of 6-methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid-hydrazinocarbonyl-phenyl ester derivatives (**11a–c**)

A solution of 1.14 mmol of the appropriate methyl ester derivatives (**10a–c**) and 6 mL of 80% hydrazine hydrate in 15 mL of ethanol, was stirred at room temperature for 2 h, when the end of reaction was observed by TLC. Then, the mixture was cooled and neutralized with concentrated HCl, resulting in the formation of a white precipitate, which was filtered, washed with water and dried under reduced pressure to give hydrazide derivatives (**11a–c**) in good yields.

#### 5.5.1. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid-3-hydrazinocarbonyl-phenyl ester derivatives (**11a**)

Derivative **11a** was obtained as white solid in 78% yield, mp 166–168 °C. IR (KBr): 3343 and 3279 (N–H), 1673 (C=O), 1350 (S=O) cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid-4-hydrazinocarbonyl-phenyl ester derivatives (**11b**)

Derivative **11b** was obtained as white solid in 81% yield, mp 130–131 °C. IR (KBr): 3348 and 3279 (N–H), 1668 (C=O), 1357 (S=O) cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.3. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid-2-hydrazinocarbonyl-phenyl ester derivatives (**11c**)

Derivative **11c** was obtained as white solid in 75% yield, mp 128–130 °C. IR (KBr): 3340 and 3275 (N–H), 1669 (C=O), 1355 (S=O) cm<sup>-1</sup>.

#### 5.6. General procedure for the preparation of 6-methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid-benzylidene-hydrazinocarbonyl-phenyl ester derivatives (**4b–j**)

An equimolar amount of appropriate aromatic aldehyde was added to a solution of hydrazide derivatives **11a–c** (1.05 mmol) in 20 mL of ethanol, in the presence of catalytic amount of hydrochloric acid. The reaction was stirred for 0.5–1.0 h, at reflux, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The colored precipitate was collected by filtration, washed with cold water and dried under vacuum to give the

desired *N*-acylhydrazone derivatives (**4b–j**), that were purified by recrystallization in ethanol, yielding compounds **4b–j** in excellent yields.

#### 5.6.1. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(pyridin-4-ylmethylene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (**4b**)

Derivative **4b** was obtained as a white solid by condensation of **11a** with pyridine-4-carboxaldehyde in 89% yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.55 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.17 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.20 (d, *J* = 7.9 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.22 (s, H<sub>2</sub>); 7.29 (s, H<sub>5</sub>); 7.58 (dt, *J* = 7.7 Hz and 7.9 Hz, H<sub>5'</sub>); 7.69 (s, H<sub>2'</sub>); 7.94 (m, H<sub>4'</sub>, H<sub>2''</sub> and H<sub>6''</sub>); 8.54 (s, CH=N); 8.77 (m, *J* = 7.9 Hz, H<sub>3''</sub> and H<sub>5''</sub>); 12.58 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 19.87 (ArCH<sub>3</sub>); 102.90 (OCH<sub>2</sub>O); 109.39 (C<sub>5</sub>); 112.44 (C<sub>2</sub>); 121.52 (C<sub>2'</sub>); 121.99 (C<sub>6'</sub>); 124.92 (C<sub>4'</sub>); 125.51 (C<sub>6''</sub>); 126.76 (C<sub>2''</sub>); 130.45 (C<sub>5'</sub>); 134.67 (C<sub>3'</sub>); 135.09 (C<sub>1</sub>); 135.61 (C<sub>6</sub>); 144.26 (C<sub>1''</sub>); 145.08 (CH=N); 147.64 (C<sub>3''</sub> and C<sub>5''</sub>); 145.76 (C<sub>4</sub>); 148.95 (C<sub>1'</sub>); 152.52 (C<sub>3</sub>); 162.56 (ArCONH) ppm.

#### 5.6.2. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (**4c**)

Derivative **4c** was obtained as a white solid by condensation of **11a** with benzaldehyde in 84% of yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.61 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.15 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.08–7.16 (m, H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub> and H<sub>6'</sub>); 7.45–7.49 (m, H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub> and H<sub>5'</sub>); 7.82–7.89 (m, H<sub>2''</sub>, H<sub>3''</sub>, H<sub>4''</sub>, H<sub>5''</sub> and H<sub>6''</sub>); 8.45 (s, CH=N); 11.90 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.34 (ArCH<sub>3</sub>); 103.37 (OCH<sub>2</sub>O); 109.89 (C<sub>5</sub>); 112.91 (C<sub>2</sub>); 121.76 (C<sub>2'</sub>); 125.45 (C<sub>6'</sub>); 126.96 (C<sub>4'</sub>); 127.67 (C<sub>3''</sub> and C<sub>5''</sub>); 129.34 (C<sub>2''</sub> and 6''); 130.73 (C<sub>5'</sub>); 130.85 (C<sub>4''</sub>); 134.62 (C<sub>3'</sub>); 135.55 (C<sub>1''</sub>); 135.72 (C<sub>1</sub>); 136.25 (C<sub>6</sub>); 148.99 (C<sub>4</sub>); 149.00 (CH=N); 149.45 (C<sub>1'</sub>); 152.99 (C<sub>3</sub>); 162.03 (ArCONH) ppm.

#### 5.6.3. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(4-nitro-benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (**4d**)

Derivative **4d** was obtained as a yellow solid by condensation of **11a** with 4-nitrobenzaldehyde in 98% of yield. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.67 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.04 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.82 (s, H<sub>2</sub>); 7.13 (d, *J* = 7.4 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.22 (s, H<sub>2'</sub>); 7.26 (s, H<sub>5</sub>); 7.40 (m, H<sub>5'</sub>); 7.65 (m, H<sub>4'</sub>); 7.85 (d, *J* = 7.6 Hz, H<sub>2''</sub> and H<sub>6''</sub>); 8.22 (d, *J* = 7.6 Hz, H<sub>3''</sub> and H<sub>5''</sub>); 8.31 (s, CH=N); 11.65 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.39 (ArCH<sub>3</sub>); 103.25 (OCH<sub>2</sub>O); 109.89 (C<sub>5</sub>); 112.90 (C<sub>2</sub>); 121.60 (C<sub>2'</sub>); 121.83 (C<sub>1''</sub>); 123.75 (C<sub>3''</sub> and C<sub>5''</sub>); 125.21 (C<sub>6'</sub>); 125.61 (C<sub>5'</sub>); 126.84 (C<sub>4'</sub>); 129.49 (C<sub>2''</sub> and C<sub>6''</sub>); 130.68 (C<sub>3'</sub>); 135.59 (C<sub>1</sub>); 136.20 (C<sub>6</sub>); 146.29 (C<sub>4</sub>); 149.38 (CH=N); 150.21 (C<sub>1'</sub>); 150.85 (C<sub>4''</sub>); 153.10 (C<sub>3</sub>); 161.53 (ArCONH) ppm.

#### 5.6.4. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(4-cyano-benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (**4e**)

Derivative **4e** was obtained as a white solid by condensation of **11a** with 4-cyanobenzaldehyde in 94% of yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.60 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.14 (s,

OCH<sub>2</sub>O); 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, H6'); 7.20 (s, H2); 7.26 (s, H5); 7.56 (dt, *J* = 8.1 Hz and 7.8 Hz, H5'); 7.64 (s, H2'); 7.86–7.94 (m, H4', H2'', H6'', H3'' and H5''); 8.48 (s, CH=N); 12.17 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.38 (ArCH<sub>3</sub>); 103.42 (OCH<sub>2</sub>O); 109.93 (C5); 112.60 (C4''); 112.96 (C2); 119.15 (ArCN); 121.90 (C2'); 125.49 (C6'); 125.79 (C5'); 127.14 (C4'); 128.25 (C2'' and C6''); 130.68 (C3'), 133.28 (C3'' and C5''); 135.45 (C1''); 135.61 (C1); 136.12 (C6); 146.29 (C4); 147.06 (CH=N); 149.50 (C1'); 153.05 (C3); 162.35 (ArCONH) ppm.

#### 5.6.5. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(4-carboxy-benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (4f)

Derivative **4f** was obtained as a white solid by condensation of **11a** with 4-carboxybenzaldehyde in 91% yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.50 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.04 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.18 (s, H2); 7.20 (s, H5); 7.22 (d, *J* = 7.9 Hz, H6'); 7.56 (dt, *J* = 8.1 Hz and 7.9 Hz, H5'); 7.62 (s, H2'); 7.84 (d, *J* = 8.3 Hz, H2'' and H6''); 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, H4'); 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, H3'' and H5''); 8.49 (s, CH=N); 11.95 (br, CONH); 12.05 (br, COOH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.35 (ArCH<sub>3</sub>); 103.38 (OCH<sub>2</sub>O); 109.89 (C5); 112.93 (C2); 121.83 (C2'); 125.48 (C6'); 125.81 (C5'); 127.04 (C4'); 127.68 (C2'' and C6''); 129.01 (C3'), 130.29 (C3'' and C5''); 132.36 (C4''); 135.58 (C1); 135.61 (C1''); 138.66 (C6); 146.27 (C4); 147.82 (CH=N); 149.46 (C1'); 153.01 (C3); 162.23 (ArCONH); 167.38 (ArCOOH) ppm.

#### 5.6.6. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(pyridine-4-carbonyl)-hydrazonomethyl-phenyl ester (4h)

Derivative **4h** was obtained as a white solid by condensation of aldehyde derivative **9a** with isonicotinic acid hydrazide in 78% yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.50 (s, ArCH<sub>3</sub>); 2.56 (ArCH<sub>3</sub>); 6.12 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.04 (d, *J* = 7.2 Hz, H6'); 7.11 (s, H2); 7.16 (s, H5); 7.42 (d, *J* = 8.9 Hz, H2'' and H6''); 7.64 (m, H4'); 7.94 (s, CH=N); 8.01 (m, H2' and H5'); 8.51 (s, CH=N); 8.9 (m, H3'' and H5''); 12.37 (br, CONH); 12.53 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.35 (ArCH<sub>3</sub>); 103.38 (OCH<sub>2</sub>O); 109.86 (C5); 112.90 (C2); 120.42 (C2'); 123.48 (C6'); 124.00 (C2'' and C6''); 125.54 (C4'); 127.01 (C5'); 131.21 (C3'); 135.52 (C6); 136.59 (C1); 143.45 (C1''); 146.11 (CH=N); 146.27 (C4); 148.18 (CH=N); 148.40 (C3'' and C5''); 149.83 (C1'); 152.99 (C3); 161.38 (ArCONH) ppm.

#### 5.6.7. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 4-(4-carboxy-benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (4i)

Derivative **4i** was obtained as a white solid by condensation of **11b** with 4-carboxybenzaldehyde in 89% yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.61 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.16 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.16 (s, H2); 7.21 (s, H5); 7.23 (d, *J* = 7.8 Hz, H2' and H6'); 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, H2'' and H6''); 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, H3' and H5'); 8.0 (d, *J* = 8.1 Hz, H3'' and H5''); 8.46 (s, CH=N); 12.05 (s, ArCONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.41 (ArCH<sub>3</sub>); 103.49 (OCH<sub>2</sub>O); 110.02 (C5); 113.03 (C2); 122.47 (C2' and C6'); 125.54 (C4'); 127.72 (C3' and C5''); 130.36 (C2'', C3'', C5'' and C6'');

132.36 (C1); 132.85 (C4''); 135.68 (C6); 138.80 (C1''); 147.45 (CH=N); 147.46 (C4); 151.85 (C3); 153.11 (C1'); 162.78 (ArCONH); 167.46 (ArCO<sub>2</sub>H) ppm.

#### 5.6.8. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 2-(4-carboxy-benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester (4j)

Derivative **4j** was obtained as a white solid by condensation of **11c** with 4-carboxybenzaldehyde in 89% yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.61 (s, ArCH<sub>3</sub>); 6.15 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.14 (s, H2); 7.21 (s, H5); 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, H6'); 7.85–8.03 (m, H3', H4', H5', H2'', H3'', H5'' and H6''); 8.47 (s, CH=N); 12.06 (s, RCO<sub>2</sub>H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.37 (ArCH<sub>3</sub>); 103.45 (OCH<sub>2</sub>O); 109.99 (C5); 112.98 (C2); 121.84 (C6' and C4'); 125.48 (C2'); 127.68 (C1 and C3'); 130.32 (C2'', C6'', C3'' and C5''); 132.31 (C4''); 132.79 (C1''); 135.64 (C5'); 138.76 (C6); 146.28 (C4); 147.43 (CH=N); 151.82 (C3); 153.06 (C1'); 162.77 (ArCONH); 167.43 (ArCO<sub>2</sub>H) ppm.

#### 5.7. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid 3-(4-amino-benzylidene-hydrazino carbonyl)-phenyl ester (4a)

A mixture of nitro-acylhydrazone **4d** (0.41 mmol), iron powder (0.123 g) and ammonium chloride (0.034 g; 0.24 mmol) in 15 mL of a mixture of ethanol and water (2:1) was refluxed for 30 min. Then, the reaction mixture was filtered hot, and the filtrate was evaporated to half of its original volume, followed by addition of 20 mL of water and extraction with AcOEt (3 × 20 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and evaporated under reduced pressure to give the desired amine-derivative in 75% yield. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.60 (s, ArCH<sub>3</sub>); 5.63 (br, ArNH<sub>2</sub>); 6.15 (s, OCH<sub>2</sub>O); 6.60 (d, *J* = 8.4 Hz, H3'' and H5''); 7.2 (m, H2 and H5 and H6'); 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, H2'' and H6''); 7.53 (dt, *J* = 8.1 Hz and 8.0 Hz, H5'); 7.60 (s, H2'); 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, H4'); 8.31 (s, CH=N); 11.58 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.38 (ArCH<sub>3</sub>); 103.40 (OCH<sub>2</sub>O); 109.93 (C5); 112.95 (C2); 114.12 (C3'' and C5''); 121.62 (C2'); 121.80 (C1''); 125.21 (C6'); 125.49 (C5''); 126.83 (C4'); 129.33 (C2'' and C6''); 130.78 (C3'), 135.58 (C1); 136.17 (C6); 146.28 (C4); 149.46 (CH=N); 150.16 (C1'); 151.68 (C4''); 153.02 (C3); 161.49 (ArCONH) ppm.

#### 5.8. 6-Methyl-benzo[1,3]dioxol-5-sulfonic acid 3-[4-(*N*-hydroxycarbamimidoyl)-benzylidene-hydrazino carbonyl]-phenyl ester (4g)

Hydroxylamine hydrochloride (0.97 mmol) was added to a solution of cyano-acylhydrazone **4e** (0.32 mmol) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.3 mmol) in ethanol (10 mL) and H<sub>2</sub>O (5 mL). The mixture was heated at reflux temperature for 8 h, then, it was cooled and neutralized with concentrated HCl, followed by extraction with AcOEt (3 × 20 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by column

chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 2% and 5%) (yield: 69%). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.49 (s, ArCH<sub>3</sub>); 3.49 (br, NH<sub>2</sub>); 5.95 (s, OCH<sub>2</sub>O); 7.1 (s, H<sub>2</sub>); 7.18 (s, H<sub>5</sub>); 7.25 (d, *J* = 7.9 Hz, H<sub>6'</sub>); 7.56 (dt, *J* = 8.1 Hz and 7.9 Hz, H<sub>5'</sub>); 7.65 (s, H<sub>2'</sub>); 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, H<sub>4'</sub>); 7.87 (d, *J* = 8.0 Hz, H<sub>2''</sub> and H<sub>6''</sub>); 7.89 (d, *J* = 8.0 Hz, H<sub>3''</sub> and H<sub>5''</sub>); 8.14 (s, CH=N); 9.9 (br, OH); 11.95 (br, CONH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.39 (ArCH<sub>3</sub>); 103.43 (OCH<sub>2</sub>O); 109.99 (C<sub>5</sub>); 112.95 (C<sub>2</sub>); 122.93 (C<sub>2'</sub>); 125.52 (C<sub>6'</sub>); 125.64 (C<sub>5'</sub>); 127.90 (C<sub>4'</sub>); 128.47 (C<sub>2''</sub> and C<sub>6''</sub>); 130.10 (C<sub>3'</sub>); 130.82 (C<sub>3''</sub> and C<sub>5''</sub>); 135.23 (C<sub>4''</sub>); 135.61 (C<sub>1</sub>); 136.26 (C<sub>1''</sub>); 146.30 (C<sub>6</sub>); 148.19 (C<sub>4</sub>); 148.36 (CH=N); 153.05 (C<sub>1'</sub>); 157.96 (C<sub>3</sub>); 168.07 (ArCONH); 168.67 (ArC=(N-OH)NH<sub>2</sub>).

### 5.9. Molecular modeling

The conformer distribution of 6-methyl-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonic acid (4-carboxy-benzylidene-hydrazinocarbonyl)-phenyl ester derivatives (**4f**, **4i**, **4j**) was carried out using SYBYL molecular mechanics. The geometry optimization was performed using the semiempirical AM1 Hamiltonian [21] with SPARTAN 1.0.5 program [22] on Pentium IV 1.5 GHz.

### Acknowledgements

The authors wish to thank financial support from IM-INO-FAR (CNPq-BR # 420.015/05-1), PRONEX (BR), FAPERJ (BR), and fellowships (CNPq (BR) LML, CAMF, EJB). We also thank Mrs. Dione M. Silva for technical assistance.

### References

- [1] A.I. Schafer, *Am. J. Med.* 101 (1996) 199–209.
- [2] J.P. Vacca, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (2000) 394–400.
- [3] J.L. Halperin, *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (2005) 1–9.
- [4] N.R. Golsack, R.C. Chambers, K. Dabbagh, G. Laurent, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 641–646.
- [5] (a) T.K. Vu, D.T. Hung, V.I. Wheaton, S.R. Coughlin, *Cell* 64 (1991) 1057–1068; (b) S.R. Coughlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 11023–11027; (c) J.I. Weitz, *Thromb. Res.* 109 (2003) S17–S22.
- [6] (a) J.H. Chesebro, M.W. Webster, P. Zoldhelyi, P.C. Roche, L. Badimon, J.J. Badimon, *Circulation* 86 (1992) 100–111; (b) B.B. Weksler, *Cerebrovasc. Dis.* 10 (2000) 41–48; (c) H.D. White, *Am. Heart J.* 138 (1999) S570–S576.
- [7] (a) G. Agnelli, F. Sonaglia, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 31 (1999) 97–117; (b) J.I. Weitz, M. Crowther, *Thromb. Res.* 106 (2002) V275–V284.
- [8] K.L. Kaplan, C.W. Francis, *Semin. Hematol.* 39 (2002) 187–196.
- [9] (a) J. Ambler, D. Bentley, L. Brown, K. Dunnet, D. Farr, D. Janus, D. Le Grand, K. Menear, M. Mercer, M. Talbot, M. Tweed, B. Wathey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 1103–1108; (b) R.M. Soll, T. Lu, B. Tomczuk, C.R. Illig, C. Fedde, S. Eisenagel, R. Bone, L. Murphy, J. Spurlino, F.R. Salemme, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 1–4; (c) K. Lee, W.-H. Jung, C.W. Park, H.D. Park, S.H. Lee, O.H. Kwon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 1017–1022; (d) A. Zega, G. Mlinšek, A. Trampuš-Bakija, M. Stegmar, U. Urleb, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1563–1567; (e) M.M. Morrisette, K.J. Stauffer, P.D. Williams, T.A. Lyle, J.P. Vacca, J.A. Krueger, S.D. Lewis, B.J. Lucas, B.K. Wong, R.B. White, C. Miller-Stein, E.A. Lyle, A.A. Wallace, Y.M. Leonard, D.C. Welsh, J.L. Lynch, D.R. McMasters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4161–4164; (f) A. Kranjc, L. Peterlin-Mašič, J. Ilaš, A. Preželj, M. Stegnar, D. Kikelj, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 3251–3256; (g) P.G. Nantermet, C.S. Burgey, K.A. Robinson, J.M. Pellicore, C.L. Newton, J.Z. Deng, H.G. Selnick, S.D. Lewis, B.J. Lucas, J.A. Krueger, C. Miller-Stein, R.B. White, B. Wong, D.R. McMasters, A.A. Wallace, J.J. Lynch- Jr., Y. Yan, Z. Chen, L. Kuo, S.J. Gardell, J.A. Shafer, J.P. Vacca, T.A. Lyle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 2771–2775; (h) A. Kranjc, L.P. Mašič, S. Reven, K. Mikic, A. Preželj, M. Stegnar, D. Kikelj, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 782–791; (i) S. Deswal, N. Roy, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1339–1346; (j) D.D. Staas, K.L. Savage, V.L. Sherman, H.L. Shimp, T.A. Lyle, L.O. Iran, C.M. Wiscount, D.R. McMasters, P.E.J. Sanderson, P.D. Williams, B.J. Lucas Jr., J.A. Krueger, S.D. Lewis, R.B. White, S. Yu, B.K. Wong, C.J. Kochansky, M.R. Anari, Y. Yan, J.P. Vacca, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 6900–6916.
- [10] (a) E.J. Barreiro, P.R.R. Costa, F.A.S. Coelho, F.M.C. de Farias, *J. Chem. Res., Synop.* (1985) 220–221; (b) E.J. Barreiro, P.R.R. Costa, F.A.S. Coelho, F.M.C. de Farias, *J. Chem. Res. Miniprint* (1985) 2301–2332.
- [11] J.P. Vacca, *Annu. Rep. Med. Chem.* 33 (1998) 81–90.
- [12] G.A. Silva, L.M.M. Costa, F.C.F. Brito, A.L.P. Miranda, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3149–3158.
- [13] L.M. Lima, C.B. Ormelli, C.A.M. Fraga, A.L.P. Miranda, E.J. Barreiro, *J. Braz. Chem. Soc.* 10 (1999) 421–428.
- [14] G.F. Lai, W.K. Anderson, *Synth. Commun.* 27 (1997) 1281–1283.
- [15] C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 167–198.
- [16] E.J. Barreiro, C.A. Camara, H. Verli, L. Brazil-Más, N.G. Castro, W.M. Cintra, Y. Aracava, C.R. Rodrigues, C.A.M. Fraga, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1144–1152.
- [17] A. Zega, G. Mlinšek, P. Šepić, G. Grdadolnik, T. Šolmajer, T.B. Tschopp, B. Steiner, D. Kikelj, U. Urleb, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 2745–2756.
- [18] G.V.R. Born, M.J. Cross, *J. Physiol.* 168 (1963) 178–195.
- [19] G.P. Lewis, I.S. Watts, *Br. J. Pharmacol.* 75 (1982) 623–631.
- [20] L.M. Lima, E.J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 23–49.
- [21] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902–3909.
- [22] Wavefunction Inc., Irvine, CA, 2000.
- [23] P. Gresele, S. Momi, M. Berrettini, G.G. Nenci, H.P. Schwarz, N. Semeraro, M. Colucci, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 667–676.

PHARMACOLOGIC CHARACTERIZATION OF THE ANTIHEMOSTATIC PROFILE OF  
ACYLHYDRAZONE DERIVATIVES

Flávia S.Frattani<sup>1,3</sup>; Eduardo O. Coriolano<sup>1</sup>; Lidia Lima<sup>2</sup>; Carlos A.M. Fraga<sup>2</sup>; Eliezer J. Barreiro<sup>2</sup>  
and Russolina B. Zingali<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Programa de Biologia Estrutural Instituto de Bioquímica Médica;*

<sup>2</sup> *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia.*

<sup>3</sup> *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem - INBEB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil.*

\* Corresponding author: Russolina B. Zingali, Av. Carlos Chagas Filho, 373 CCS Bloco H2 sala 04, Cidade Universitária, Rio de Janeiro 21941-902, RJ Brazil  
Phone (fax): +55 21 2562 6782  
E-mail address: [lzingali@bioqmed.ufrj.br](mailto:lzingali@bioqmed.ufrj.br)

## ABSTRACT

Searching for new compounds that have potential antithrombotic activity, we have previously described the synthesis of a new series of N-acylhydrazones. In this work we have tested four compounds (LASSBio 693, 694, 743 and 752) in rat platelet. Each compound (200  $\mu$ M) lead to a minimum of 36 and a maximum of 82% inhibition (for L-743 and L-752, respectively) of thrombin induced platelet aggregation. We also used the receptor agonist for PAR-4: TRAP-4A (250  $\mu$ M) and an inhibition between 43 and 77 % was observed in the presence of 200  $\mu$ M of LASSBio compounds. Any of them effectively inhibited the platelet aggregation induced by ADP (5  $\mu$ M), confirming a greater selectivity for thrombin. Only LASSBio 693 compound showed to have a direct effect toward thrombin catalytic activity. These compounds were further tested *in vivo*, in mice, using a pulmonary thromboembolism model induced by I.V. injection of collagen and norepinephrine (both 500  $\mu$ g/mL) or thrombin (2000 UI). All compounds, orally administrated, showed effective antithrombotic action, independently of the thrombotic stimulus. Compounds LASSBio 752 and 743 were the most effective. They also reduced venous thrombus formation in an animal model that combines hypercoagulability with stases. Up to now our results indicate that compounds LASSBio 743 and 752 are potential candidates for utilization in the treatment of cardiovascular diseases.

**Keywords:** Platelet; PAR; Thromboembolism pulmonary; Antiplatelet drugs.

### **Abbreviations:**

PAR

TXA2

## INTRODUCTION

Platelet aggregation plays a critical role in the pathophysiology of thrombotic diseases. Under normal conditions, platelets circulate freely in the blood and do not adhere to each other. Following vessel wall injury, platelets adhere to the exposed subendothelium and become activated. Platelet activation includes a series of rapid positive feedback loops such as synthesis of TXA<sub>2</sub> or release of nucleotides, which greatly amplify the activation signals and enable robust platelet recruitment at the site of vascular injury leading to the formation of the so-called haemostatic plug. The same mechanisms are involved when platelets are activated at the site of an atherosclerotic plaque rupture, leading to vessel occlusion and, depending on the vascular bed involved, ischemic diseases such as myocardial infarction, stroke, or peripheral artery [1]. Upon various agonists clustering with respective receptors on platelet surface, the intracellular signals will be activated and platelets will change shape, spread, and release or secrete activating substances to recruit platelets to the developing thrombus. Thus, antiplatelet therapy is a useful means of preventing acute thromboembolic artery occlusions in cardiovascular diseases. [2]

Thrombin is a serine protease that catalyzes the cleavage of fibrinogen, other clotting factors and the thrombin receptors and as a result activates the coagulation system and platelet response. As such, thrombin is considered to play a central role in hemostasis and thrombosis. Cloning of a functional thrombin receptor was described [3] and the proteolytic mechanism for activation was elucidated [4]. The thrombin receptor is a G protein-coupled receptor (Protease Activated Receptors -PARs) activated by a unique mechanism involving proteolytic cleavage of the receptor by thrombin. PAR-1, the prototype for this family, is activated when thrombin cleaves its amino-terminal exodomain at the R41/S42 peptide bond [3]. The hydrolysis will then expose a new amino terminus beginning with the sequence SFLLRN, which serves as a tethered peptide agonist, binding intramolecularly to the body of the receptor to effect transmembrane signaling. PARs are thus in essence peptide receptors that carry their own ligands, which remain silent until unmasked by site-specific receptor cleavage. Synthetic peptides that mimic these tethered ligands function as PAR agonists and activate their receptors independent of protease and receptor cleavage. Such peptides have been extremely useful for probing the roles of PARs in cells and tissues. PAR-4 is another characterized thrombin receptor that is expressed in human platelets along with PAR1. Human PAR4 is activated when thrombin cleaves its amino-terminal exodomain at the Arg-47/Gly-48 peptide bond to unmask the tethered ligand GYPGQV [5].

Mouse and rat platelets express PAR-4 and PAR-3 but not PAR-1. PAR-3 serves as a co-factor for PAR-4 activation on mouse platelet [6-8]. Both PAR-4 and PAR-3 knock-out mice are protected against arterial thrombosis [9] indicating that PAR inhibition might be explored for the prevention or treatment of thrombosis in human.

Cardiovascular disease and stroke are major causes of morbidity and mortality. Although many pathophysiologic processes play a role in the chronic development of cardiovascular disease, thrombosis is often the event that precipitates stroke and acute coronary syndromes. Although the established antiplatelet agents aspirin and ticlopidine, and anticoagulant agents heparin and warfarin have provided remarkable achievements in the treatment of thromboembolic diseases, yet these drugs have considerable limitations. In particular, the incidence of major ischaemic cardiovascular events remains high and complications associated with bleeding represent a major drawback [10-12]. The contributions of PARs to coagulation have also been investigated *in vivo* by use of antagonists to PAR1. In cynomolgus monkeys, whose platelets express PAR1 and PAR4, an antagonist of PAR1 inhibits thrombus formation and vessel occlusion in a model of electrolytic injury of the carotid artery [13].

Our previous studies showed that the compounds (LASSBio 693, 694, 743 and 752) showed greater inhibitory activity in the assay of thrombin induced platelet aggregation using rabbit platelet [14].

In this work, we elucidated the differences in pharmacological profile between these acylhydrazones derivatives (LASSBio 693, 694, 743 and 752) and Indometacin by the evaluation of platelet aggregation and plasma clotting activities using rat platelet and blood. Here we correlate the inhibitory action of the tested substances with thrombin activity and assessed their potential antithrombotic activity *in vivo*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Hydrolysis of chromogenic substrate*

Thrombin proteolytic activity was measured using S-2238, a chromogenic substrate. In a cuvette containing 0.1 M Tris-HCl buffer pH=7.5, drug or vehicle and human thrombin (0.01 U/mL) final concentration, were added and incubated at 37°C for 2 min when the substrate S-2238 (50 µM final concentration) was added to initiate the enzyme reaction. The rate of increase in absorbance at 405 nm was measured with a Termomax Microplate Reader, Molecular Devices, Menlo Park, USA.

### *2.2. Hydrolysis of fibrinogen*

Thrombin activity was measured using human fibrinogen. In a cuvette containing 0.1 M Tris-HCl buffer pH=7.5, drug or vehicle and human thrombin (0.01 U/mL final concentration), were added and incubated at 37°C for 2 min when the fibrinogen (2 mg/mL final concentration) was

added to initiate the enzyme reaction. The rate of increase in absorbance at 405 nm was measured with a Termomax Microplate Reader, Molecular Devices, Menlo Park, USA.

### *2.3. Coagulation assay measured by recalcification time*

Blood was collected from anesthetized rat by cardiac puncture into syringes containing 3.8% sodium citrate. Platelet-poor plasma was obtained by centrifugation of blood at 1500 X g for 10 min. The effect of acylhydrazones derivatives on rat plasma coagulation was assessed by measuring the recalcification time on an Amelung KC4A Coagulometer, Labcon, Heppenheim, Germany. Citrated rat plasma (50  $\mu$ L containing 3.8% sodium citrate, 1:9, v/v) was incubated with 50  $\mu$ L of derivatives acylhydrazones (suspension in 20% DMSO and 80% TBS) for 1 min at 37 °C. Plasma clotting was initiated by addition of 100  $\mu$ L of 25 mM CaCl<sub>2</sub> and coagulation time was recorded.

### *2.4. Preparation of platelet-rich plasma and platelet suspension washed platelets*

Blood was collected from anesthetized rat by cardiac puncture into syringes containing 3.8% sodium citrate (1/10 volume) or 2 mM EDTA as anticoagulant. Platelet-rich plasma was obtained from the supernatant fraction of blood citrated after centrifugation at 150 X g for 10 min. Platelet-poor plasma was obtained by centrifugation of the remaining blood at 1500 X g for 10 min. When PRP was obtained with EDTA was further centrifuged at 800 X g for 10 min at room temperature and the pellet was re-suspended in an equal volume of a modified Tyrode's buffer which containing 103 mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 36 mM citric acid, 3.8 mM HEPES, 5 mM glucose and 0.35% bovine serum albumin adjusted to pH 7.5.

### *2.5. Measurement of platelet aggregation*

Platelet aggregation was measured according to the turbidimetric method of Born and Cross [15] with a Chrono-log model 490 optical aggregometer, Havertown, PA, USA. In the cuvette, platelet-rich plasma or washed platelets were pre-incubated for 2 min at 37 °C after the addition of drug or vehicle. In order to quantify the inhibitory effects of each drug, the maximum increase in light transmission was determined from the aggregation curve for 5 min after the addition of agonist. The concentration of agonist used was determined by the establishment of a dose-response curve for each experiment using on minimum agonist concentration that leads to 100% of response. The effect of each drug was expressed as percentage of inhibition of agonist-induced platelet aggregation compared with vehicle treatment. The IC<sub>50</sub> value was obtained by linear regression,

and is expressed as the drug concentration required producing 50% inhibition of agonist-induced platelet aggregation in comparison to vehicle treatment.

## 2.6. Antithrombotic activity

Pulmonary thromboembolism in mice was induced by a method described previously [16]. It was determined *in vivo* using albino mice of both sexes (20-25 g). Compounds were administered orally (100  $\mu\text{mol/kg}$ ; 0.1 ml/20 g) as a suspension in 5% arabic gum in saline (vehicle) 60 minutes before the thrombogenic stimulus. Indomethacin (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) was used as the positive control drug under the same conditions. Thrombotic event was induced by collagen (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) plus norepinephrine (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) or thrombin (2000 UI). The dose of thrombin or collagen used was selected from a concentration/response curve as the minimal dose giving a reproducible 80-90% mortality in the control group (data not shown). The data were expressed as the percentage of survival animals evaluated 15 minutes after thrombotic event. The animals which did not die within this time were sacrificed by exposure to ether vapors and were recorded as survivors. No anesthesia was used during the experiment because anesthesia interferes with thromboembolism in this model. Results shown represent 3 groups of 10 animals each. This study was approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments of the UFRJ (IBqM 004).

## 2.7. Stasis-induced Thrombus Formation

Compounds were administered orally (100  $\mu\text{mol/kg}$ ; 0.1 ml/20 g) as a suspension in 5% Arabic gum in saline (vehicle). Indomethacin (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) was used as the positive control drugs under the same conditions. Drugs were administered 1-2 hours before the thrombosis induction. Thrombus formation by a combination of stasis and hypercoagulability was induced after administration of each compound as described by Mendes-Silva and coworkers [17] with slight modifications. The animals were previously anesthetized with xylazin (16 mg  $\text{kg}^{-1}$ , intramuscularly) followed by ketamin (100 mg  $\text{kg}^{-1}$ , intramuscularly). The abdomen was surgically opened, and after careful dissection the vena cava was exposed and dissected free from surrounding tissue. Two loose ligatures were prepared 1 cm apart on the inferior vena cava just below the left renal vein. Thrombosis was induced by the i.v. injection of thromboplastin (3 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) and stasis was immediately established by tightening the proximal suture. Tightening of the distal suture was performed 20 min after administration thromboplastin or phosphate-buffer pH 7.4 (control group) and the ligated segment was removed. The formed thrombus was removed from the segment, rinsed, blotted on filter paper, dried for about 1 hour at 60  $^{\circ}\text{C}$ , and weighed. The protocol received official approval with regard to the care and use of laboratory animals (IBQM 04).

## RESULTS

### 3.1. *Effects of derivatives acylhydrazones on thrombin enzymatic activity and clotting assay*

Since acylhydrazones were first designed in order to mimicry the peptide bound and we have previously shown that they inhibited specifically thrombin induced platelet aggregation [14] we decided to evaluate if they would directly affect thrombin catalytic activity.

The effects of compounds acylhydrazones derivatives on thrombin protease activity was assessed using chromogenic substrate S-2238 and are shown in Figure 1A. Only the compound LASSBio 693 inhibited dose-dependently thrombin protease activity. However, LASSBio 694, 743 and 752 did not influence thrombin protease activity even at higher concentration (500  $\mu$ M).

The effects of derivatives acylhydrazones compounds on thrombin induced fibrinogen clotting activity was assessed using human fibrinogen and is shown in Figure 1-B. In this case only the LASSBio 694 compound dose-dependently inhibited fibrinogen clotting activity. Concentration of 200 and 400  $\mu$ M lead to an inhibition of about 28 and 55 %, respectively. Since the compound did not affect the catalytic site of the enzyme (Figure 1-A), it is possible that this effect is due to an interaction with other thrombin site different from the catalytic site.

We also evaluated a possible activity toward other coagulation factors measuring the recalcification time of rat platelet-poor plasma (PRP). None of the compounds (200  $\mu$ M) was able to extend the clotting time suggesting then that they do not inhibit other factors of the coagulation (data not shown).

### 3.2. *In vitro antiplatelet activities of derivatives acylhydrazones*

In order to evaluate if these compounds were implicated with thrombin activation pathway in platelets we tested it effect toward PAR-4 activation. The inhibitory effects of acylhydrazones derivatives on thrombin-, TRAP-4A- and ADP-induced aggregation of rat washed platelets are shown in Fig. 2. All compounds showed inhibitory activity, of platelet aggregation in a dose-dependent manner. Figure 2-A shows the results obtained for platelet aggregation induced by thrombin (10 nM). LASSBio 693, 694, 743 and 752 (200  $\mu$ M) inhibited by 50, 64, 36 and 82.5 % respectively, the aggregation response.

We evaluate the interference in the direct activation of PAR-4 receptor using the receptor agonist TRAP-4 (AYPGKF), [18]. The inhibitory effects of acylhydrazones derivatives on TRAP-4A-induced aggregation of rat washed platelets are shown in Figure 2 -B. Inhibition of 76.5 , 58 43 and 53 % was obtained using 200  $\mu$ M of each compound LASSBio 693, 694, 743, 752, respectively (Figure 2 -B).

We also tested the acylhydrazones derivatives on platelet aggregation induced by ADP, results are show in Figure 2-C. We obtained a maximum of 40% of inhibition for LASSBio 694 (200  $\mu$ M), other compounds were even less actives. These data suggest that in the compounds are more specific to thrombin, since only very high concentrations (600  $\mu$ M) achieve 60 to 80 % of inhibition with this agonist.

The IC<sub>50</sub> values calculated for all compounds on platelet aggregation induced by thrombin, TRAP-4A and ADP are shown in Table 1. These values show that the compound LASSBio 752 presents a lower IC<sub>50</sub> when platelet aggregation was induced by thrombin while the compounds L-693 and L-694 have lower IC<sub>50</sub> when platelet aggregation was induced by TRAP-4A.

### *3.3 Effects of acylhydrazones derivatives in thrombosis induced in vivo*

We demonstrated here that acylhydrazones derivatives prevents death from acute pulmonary embolism in mice as shown in Figure 3 (induced by collagen plus norepinephrine) and in Figure 4 (induced by thrombin). The dose of collagen plus norepinephrine and human thrombin used was established, from dose-response curves (data not show). The I.V. injection of collagen plus norepinephrine (0.5  $\mu$ g/mL, both) led to death or prolonged paralysis of 75 % of control group. The assay induced by collagen plus norepinephrine evaluates, an thrombotic activity more directed toward platelets, since the collagen injection mimics a situation of vascular injury (Momi et al 2000). Oral pretreatment of animals with acylhydrazones derivatives (100  $\mu$ mol/kg) orally, 60 min before the I.V. injection of collagen plus norepinephrine, exerted protective effect against mortality. Figure 3 summarizes the result obtained, where we can observe that, the all compounds (LASSBio 693, 694, 743 and 752) showed an antithrombotic potential increasing the survival of the treat animals by 56, 36, 63 and 46 % respectively, as compared to control group in which only 25 % of animals survived.

When the thrombogenic stimulus was induced by thrombin (2,000 U/kg) 84 % mortality was obtained for the control group. The acylhydrazones derivatives also protected mice from death. Figure 4 shows results where LASSBio 693, 694, 743 and 752 showed an antithrombotic potential increasing the survival of the animals to 53, 33, 80 and 80 %, respectively when compared to control group in which only 16 % of animals survived.

The acylhydrazone compounds were also tested in a model of thrombosis induced in the vena cava vein in rats. Interestingly in this model compounds LASSBio 743 and 752 displayed antithrombotic effect in the tested doses as shown in figure 5.

So far our results indicate that compounds LASSBio 743 and 752 are potential candidates for the treatment or prevention of thromboembolic conditions by oral administration.

## DISCUSSION

The study of natural or synthetic inhibitors of the hemostatic process, as well as the detailed structural briefing of the enzymatic specificity of blood factors enzymes or platelet receptors are important sources of information for the design of new antithrombotics drugs. Due the potential importance in physiopathological processes, currently it exists an enormous investment of the pharmaceutical industries and groups of research for the development of highly specific synthetic inhibitor.

The described acylhydrazones derivatives in this work had been drawn from the rationally planned archetypes argatroban as thrombin inhibitors [14-19]. Our group has previously showed that LASSBio 693, 694, 743 and 752 seems to act specifically toward thrombin induced platelet aggregation [14]. Nevertheless, we have shown here that only LASSBio 693 showed low potential to inhibit thrombin catalytic activity toward chromogenic substrate while LASSBio 694 inhibited only fibrinogen clotting in high concentration. On the other hand any of these compounds induced prolongation of clotting time indicating that they are not anticoagulant as expected for direct thrombin inhibitors. Drugs such ximelagatran or argatroban that inhibits thrombin at catalytic site are able to prolong clotting time [20-21]. Another class of thrombin inhibitors are the bicyclic lactam inhibitors that presents inhibitory activity toward thrombin, they rapidly inhibit thrombin with a  $K_i < 10$  nM; they are highly selective and without effect on proteases of the anticoagulation [22].

Since LASSBio 693, 743 and 752 showed to specifically inhibit thrombin induced rabbit platelet aggregation [14]. We focused our attention on thrombin platelet receptors specially PAR in rat platelet. The PAR receptors are express in some types cellular, being therefore, involved also in distinct processes other than hemostasis. [23-24].

Human platelets express PAR-1 and PAR-4, whereas the mouse and rat platelets express PAR-3 and PAR-4. In mouse and rat platelets, PAR-3 serves as a co-receptor for PAR-4 wherein thrombin binds to PAR-3 and PAR-4, and cleaves the amino terminus of PAR-4 [6, 25]. Again using rat platelet we have been the able to confirm the capability of these molecules to inhibit thrombin induced aggregation. In order to access the effect toward PAR-4 we used TRAP-4A (AYPGQV-NH<sub>2</sub>) to induced platelet aggregation in the presence of these molecules. The compound LASSBio 693 inhibited the rat platelet aggregation ( $IC_{50}=151.1$   $\mu$ M) induced by TRAP-4A similarly to other selective inhibitory molecules such as YD-3. YD-3 inhibited the aggregation platelet of rabbit platelets ( $IC_{50}=28.3$   $\mu$ M) and human platelets ( $IC_{50}=0.13$   $\mu$ M) [26-27]. On the other hand, LASSBio 693 also inhibited the platelet aggregation induced by ADP, even so demonstrating a distinct profile of that one presented by the indometacin. The data presented here indicate that the LASSBio 693 compound may present two mechanisms of inhibition of the platelet aggregation: inhibiting PAR-4 receptor and/or signaling.

The LASSBio 743 has been capable to moderately inhibit the platelet aggregation induced by thrombin ( $IC_{50} > 200$   $\mu$ M) and LASSBio 752 significantly inhibited the platelet aggregation

induced by this agonist ( $IC_{50}$  = 109.8  $\mu$ M) Nevertheless, LASBio 743 did not show significant inhibition when the aggregation was induced by the agonists of receptor PAR-4 or ADP. As well as LASBio 753 which had its  $IC_{50}$  increased when the agonist used was TRAP-4.

The current drugs for the prevention and the treatment of the venous thromboembolism (VTE) include the heparin, of low molecular weight heparins and warfarin [27-28]. Presently these compounds possess disadvantages. Because of that numerous studies are being conducted in order to describe new antiplatelets and anticoagulant drugs. For that reason we decided to analyze the profile of these compounds different thrombosis models *in vivo*.

LASSBio 693, 743 and 752 showed an antithrombotic potential when the thromboembolism pulmonary was induced by norepinephrine and collagen or thrombin, increasing the percentage of survival of the animals treated in relation to the control group. On the other hand only LASSBio 743 and 752 showed to impair venous thrombosis formation. None of these compounds lead to an hemorrhagic bleeding (data not shown). Some correlation between *in vitro* and *in vivo* activity can be observed. LASSBio 694 which presents a moderate activity toward thrombin but also inhibited ADP (this study) and collagen (14), showing a broader profile, has only a mild protection against thromboembolism. LASSBio 693 that presented a better effect against PAR-4, was also effective to protect from thromboembolism but, at doses tested it was inefficient to prevent venous thrombus formation. LASSBio 752 presented the best inhibition toward thrombin induced platelet aggregation and could prevent thromboembolism and venous thrombus formation. Interestingly LASSBio 743 has been capable to moderately inhibit the platelet aggregation induced by thrombin, this did not show significant inhibition when the aggregation was induced by the agonists of receptor PAR-4 or ADP. Nevertheless this compound presented very important antithrombotic potential, significantly increasing the survival of the animals in relation to the groups controls (two assays) and also prevent venous thrombus formation. The mechanism of action of these compounds, specially LASSBio 743, is yet to be clarified. Since these compounds are given orally for the animals we can not discard a possible metabolization that will lead to more effective compounds. This hypothesis is under investigation in our laboratory.

In summary, the activity profile of this new class of acylhydrazones indicate a potential antithrombotic activity: which may in part be correlated with the preferential inhibition of thrombin induced platelet aggregation rather than anticoagulation activity. An important observation is that the antithrombotic activity was observed by oral administration. This novel class of compounds has potential for therapeutics application for thromboembolism and venous thrombosis.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and The National Institute of Structural Biology in

Biomedicine and Biotechnology (INBEBB) and fellowships CNPq (BR) LML, CAMF, EJB, RBZ and FSF. We thanks Dione Maria da Silva for technical assistance.

## REFERENCES

- [1] Gachet C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther* 2005; 108:180–192.
- [2] Jin Y, Yu. J, Lee. J, You. S, Chung J, Noh J, Im J, Han X, Kim T, Shin K, Wee J, Yun Y. Antithrombotic and Antiplatelet Activities of Korean red ginseng extract. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100(3):170-5.
- [3] Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64:1057-1068.
- [4] Coughlin SR, Vu TK-H, Hung DT, Wheaton VI. Characterization of the cloned platelet thrombin receptor: issues and opportunities. *J Clin Invest* 1992; 89:351–355.
- [5] Coughlin SR, Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W. Structure-Function Analysis of Protease-activated Receptor 4 Tethered Ligand Peptides. *J Biol Chem* 2000; 275:19728-19734.
- [6] Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998; 394(6694):690-4.
- Key N, Negrier C. Coagulation factor concentrates: past, present, and future. *Lancet* 2007; 370:439–48.
- [7] Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. () PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 2000; 404(6778):609-13.
- [8] Bah A, Chen Z, Bush-Pelc LA, Mathews FS, Di Cera E. Crystal structures of murine thrombin in complex with the extracellular fragments of murine protease-activated receptors PAR3 and PAR4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(28):11603-8.
- [9] Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, Coughlin SR. Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* 2002; 100(9):3240-4.
- [10] Gresele P, Agnelli G. Novel approaches to the treatment of thrombosis *TRENDS in Pharm Scienc* 2002; 23(1): 25-32.
- [11] Morrell, C. N.; Sun, N.; Ikeda, M.; Beique, J. C. ;Swaim, A. N.; Mason, E.; Martin, T.; Thompson, L.; Gozen, O.; Ampagoomian, D.; Sprengel, R.; Rothstein, J.; Faraday, N.; Huganir, R. and Lowenstein, C. J. Glutamate mediates platelet activation through the AMPA receptor. *J Exp Med* 2008; 20:575-584.
- [12] Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008; 451:914-918.
- [13] Derian CK, Maryanoff BE, Zhang HC, Andrade-Gordon P. Therapeutic potential of protease-activated receptor-1 antagonists. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12(2):209-21.

- [14] Lima LM, Frattani FS, Dos Santos JL, Castro HC, Fraga CA, Zingali RB, Barreiro EJ. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate--acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *Eur J Med Chem* 2008; 43(2):348-356.
- [15] Born GV, Cross MJ. The Aggregation of Blood Platelets *J Physiol* 1963; 168:178-95.
- [16] Gresele P, Momi S, Berrettini M. Activated human protein C prevents thrombin-induced thromboembolism in mice. Evidence that activated protein C reduces intravascular fibrin accumulation through the inhibition of additional thrombin generation. *J Clin Invest* 1998; 101: 667-76.
- [17] Mendes-Silva W, Assafim M, Ruta B, Monteiro RQ, Guimarães JA, Zingali RB. Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor *Thromb Res* 2003; 112(1-2):93-8.
- [18] Soslau G, Class R, Morgan DA, Foster C, Lord ST, Marchese P, Ruggeri ZM. Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein-Ib. *J Biol Chem* 2001; 276(24):21173-83.
- [19] Reis AL, Ormelli CB, Miranda AL, Fraga CA, Barreiro EJ. Studies on antiplatelet agents from natural safrole. II. Synthesis and pharmacological properties of novel functionalized oxime O-benzylether derivatives. *Pharm Acta Helv* 1999; 74(1):19-28.
- [20] Nilsson T, Sjöling-Ericksson A, Deinum J. The mechanism of binding of low-molecular-weight active site inhibitors to human alpha-thrombin. *J Enzyme Inhib* 1998; 13(1):11-29.
- [21] Ho SJ, Brighton TA. Ximelagatran: direct thrombin inhibitor. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2(1):49-58.
- [22] Leblond L, Grouix B, Boudreau C, Yang Q, Siddiqui MA, Winocour PD. In Vitro and in Vivo Properties of Bicyclic Lactam Inhibitors: A Novel Class of Low Molecular Weight Peptidomimetic Thrombin Inhibitors. *Thromb Res* 2000; 100: 195–209.
- [23] Ossovskaya VS, Bunnnett NW. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Am Physio Soc* 2004; 84: 579–621.
- [24] Soslau G, Ando A, Floyd L, Hong T, Mathew L and Yen Y. () Effect of low and high dose melagatran and other antithrombotic drugs on platelet aggregation. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 25:198-203.
- [25] Mao Y, Jin J, Kunapuli SP. Characterization of a new peptide agonist of the protease-activated receptor-1. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(2):438-47.
- [26] Wu CC, Huang SW, Hwang TL, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YD-3, a novel inhibitor of protease-induced platelet activation. *Br J Pharmacol* 2000; 130(6):1289-96.
- [27] Wu CC, Hwang TL, Liao CH, Kuo SC, Lee FY, Lee CY, Teng CM. Selective inhibition of protease-activated receptor 4-dependent platelet activation by YD-3. *Thromb Haemost* 2002; 87(6):1026-33.

[28] Prandoni P, Bernardi E, Bagatella P, Piccioli A, Marchiori A. The optimal treatment of venous thrombosis: current status and future perspectives. *Clin Lab* 2001; 47(3-4):151-4.

[29] Prandoni P, Simioni P, Pagnan A. Therapeutic indications for acute venous thromboembolism. Current status and future perspectives. *Minerva Cardioangiol.* 2003; 51(4):361-71.

## Figure Legends

### **Figure 1: Inhibitory effect acylhydrazone derivatives upon $\alpha$ -thrombin catalytic activities.**

Compounds were incubated with  $\alpha$ -thrombin (2 nM, final concentration) for 1 min prior to addition of **(A)** S-2238 (0.2 mM, final concentration) or **(B)** fibrinogen human (0.2 mM, final concentration). The rate of hydrolysis in the absence of acylhydrazones was taken as 0% inhibition. Curves are one representative of three independent experiments.

### **Figure 2: Effect of acylhydrazone derivatives on platelet aggregation.**

Washed rat platelets were used for platelet aggregation induced by **(A)** thrombin (10 nM, final concentration) and **(B)** TRAP-4A (AYPGKF) (0.25 mM, final concentration). Acylhydrazones at 50  $\mu$ M (black columns), 100  $\mu$ M (gray columns) or 200  $\mu$ M (white columns) were preincubated for 1 min with platelet prior to addition of agonists (thrombin and TRAP-4A). Platelet-rich plasma was used for aggregation platelet induced by **(C)** ADP (6  $\mu$ M, final concentration). and compounds at 200  $\mu$ M (black columns), 400  $\mu$ M (gray columns) or 600  $\mu$ M (white columns) were preincubated for 1 min with platelet prior to addition of ADP. Indometacin was used as positive control. Inhibitory action was represented as ratio vs. aggregation of platelets when DMSO was added in solution with washed platelets or platelet-rich plasma. Results shown represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### **Figure 3: Antithrombotic effect of compounds in a pulmonary thromboembolism model induced by collagen and epinephrine.**

Acylhydrazones derivatives or indometacin were given orally (100  $\mu$ mol/kg; 0.1 ml/20 g) as a suspension in 5 % arabic gum in saline (vehicle), 60 min before i.v. injection of the thrombogenic stimulus. Thrombotic event was induced by a suspension of the collagen and norepinephrine (0.5 mg/ml), and the survival rate was evaluated 15 minutes after thrombotic event. Results shown represent the mean  $\pm$  SD of 3 groups of 10 animals each.

### **Figure 4: Antithrombotic effect of compounds in a pulmonary thromboembolism model induced by thrombin.**

Acylhydrazones derivatives or indometacin were given orally (100  $\mu$ mol/kg; 0.1 ml/20 g) as a suspension in 5% arabic gum in saline (vehicle), 60 min before i.v. injection of the thrombogenic stimulus. Thrombotic event was induced by human thrombin (2000 UI/kg animal), and the survival

rate was evaluated 15 minutes after thrombotic event. Results shown represent the mean  $\pm$  SD of 3 groups of 5 animals each.

**Figure 5: Antithrombotic effect of compounds in a stasis-induced venous thrombosis model.**

Acylhydrazones derivatives were given orally (100  $\mu$ mol/kg; 0.1 ml/20 g) as a suspension in 5% arabic gum in saline (vehicle), 60 min before i.v. injection of the thrombogenic stimulus. The cava vein was exposed and the thrombotic event was induced by thromboplastin (3 mg/kg) and stasis after 20 min the thrombus was weighed ival Results shown represent the mean  $\pm$  SD for each compound tested.

Table 1: IC<sub>50</sub> the Acylhydrazone derivatives on platelet aggregation induced by physiological and synthetic agonists.

<b><i>Compounds</i></b>	<b><i>Thrombin</i></b>	<b><i>TRAP-4A</i></b>	<b><i>ADP</i></b>
Indometacin	139,7 µM	ND (> 200 µM)	418,5 µM
L-693	184,7 µM	151,1 µM	394,8 µM
L-694	139 µM	158,8 µM	335,2 µM
L-743	ND (> 200 µM)	ND (> 200 µM)	497,0 µM
L-752	109,8 µM	171,6 µM	362,7 µM

Figure 1

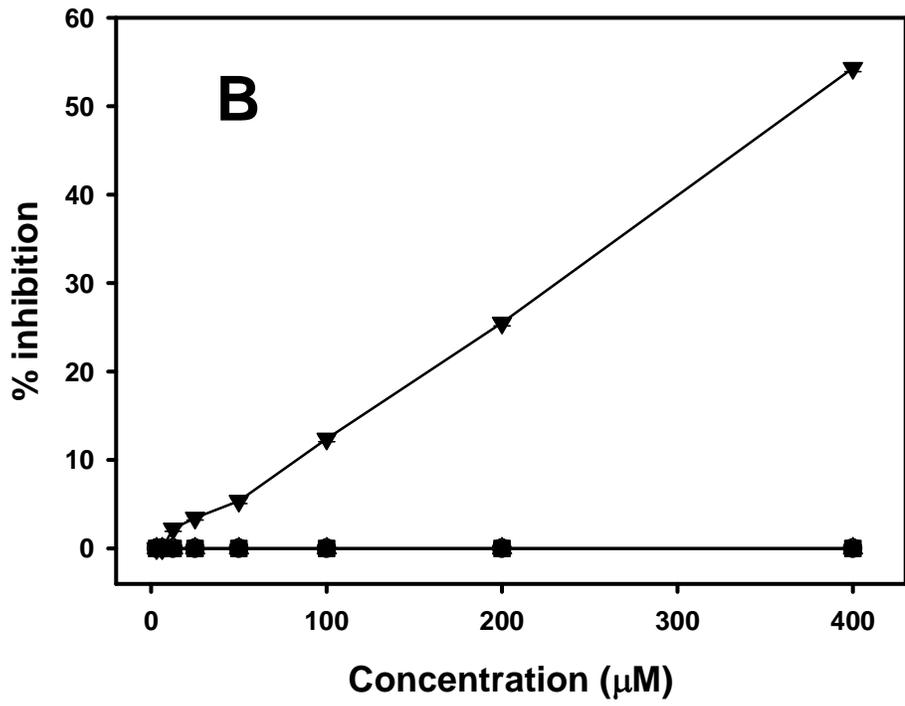
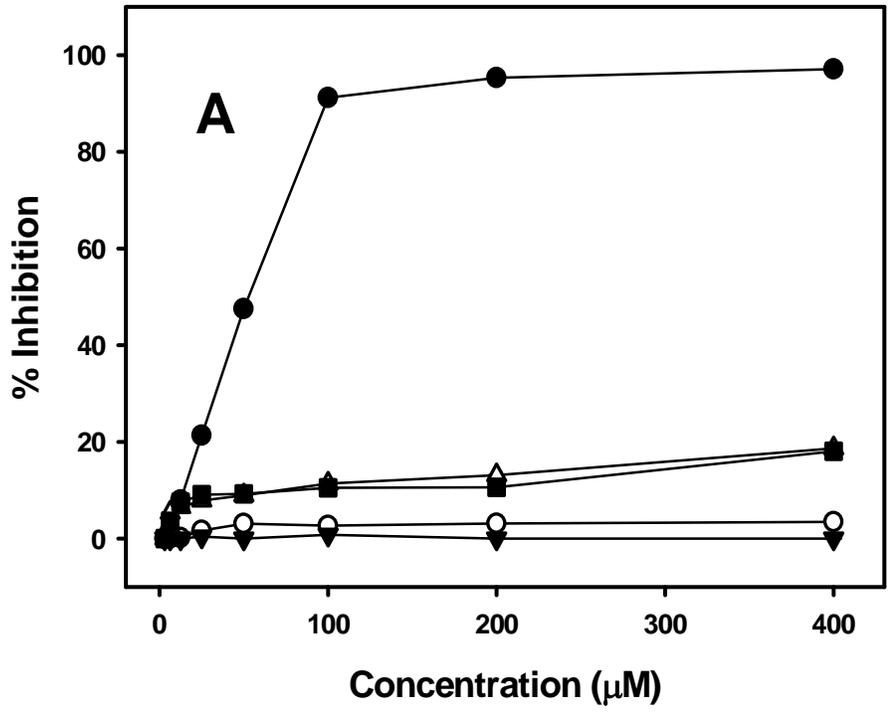


Figure 2

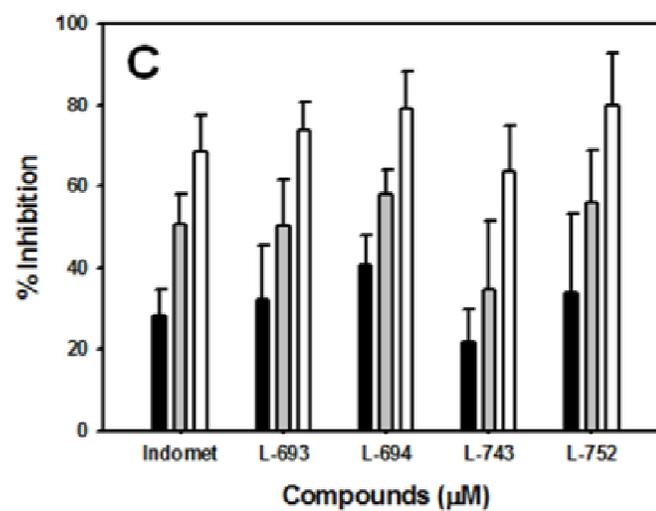
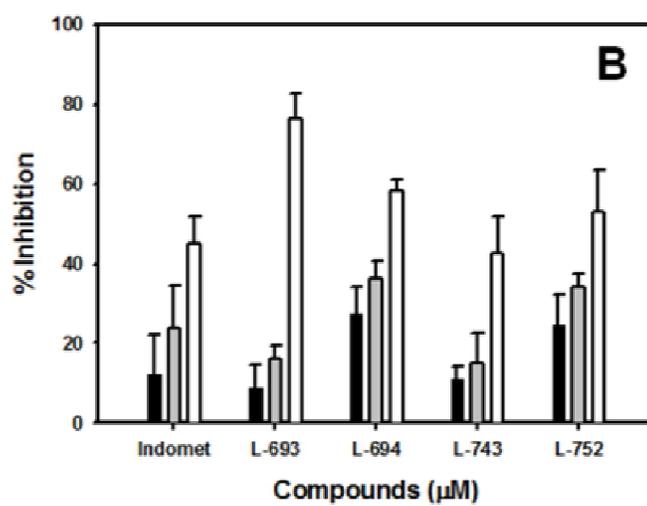
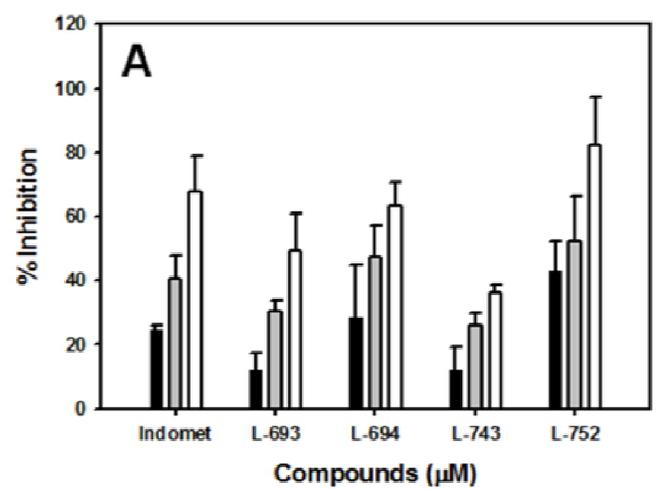


Figure 3




Figure 4





Figure 5



Nome: Flávia Serra Frattani Ferreira

Nascimento: 23/07/1978

Naturalidade: Rio de Janeiro

● Formação acadêmica:

- Faculdade de Farmácia – pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, agosto de 2008 a fevereiro de 2003

- Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro

- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro

● Orientação de estudante:

- Eduardo Coriolano de Oliveira – Iniciação Científica de julho de 2006 até dezembro de 2008.

- Kenny Rangel da Silva – Projeto Jovens Talentosos de julho de 2007 até junho de 2008 (Atualmente aluna de Iniciação científica do Instituto de Bioquímica Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro, desde julho de 2008)

● Comunicação em Congresso:

- 20 comunicações em congressos nacionais.

- 4 comunicações em congressos internacionais.

● Publicações:

WERMELINGER, L. S.; GERALDO, R. B.; FRATTANI, F.S.; RODRIGUES, C.R.; JULIANO, M. A.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Integrin inhibitors from snake venom: exploring the relationship between the structure and activity of RGD-peptides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 482, p. 25-32, 2009.

LIMA, L. M.; Frattani, F.S.; Dos Santos, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A. M.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 1, p. 1-2, 2007.

ASSAFIM, M.; FERREIRA, M.S.; Frattani, F.S.; GUIMARAES, J. A.; MONTEIRO, R. Q.; ZINGALI, R. B. Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic abnormalities induced by Bothrops jararaca snake venom.. *British Journal of Pharmacology*, v. 148, p. 807-813, 2006.

ZINGALI, R. B.; FERREIRA, M.S.; ASSAFIM, M.; Frattani, F.S.; MONTEIRO, R. Q. Bothrojaracin, a Bothrops jararaca snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule.. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, v. 34, p. 160-163, 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)