



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FÁRMACOS ANTITROMBÓTICOS, OS MÉTODOS
USADOS NOS TESTES CLÍNICOS - ESTADO DA ARTE EM
2017**

Trabalho submetido por
Samuel Galindo Caraballo
para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Fevereiro 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FÁRMACOS ANTITROMBÓTICOS, OS MÉTODOS
USADOS NOS TESTES CLÍNICOS - ESTADO DA ARTE
EM 2017**

Trabalho submetido por
Samuel Galindo Caraballo
para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Doutora Zilda Morais

Fevereiro 2018

AGRADECIMENTOS

Sou espanhol e antes de mais, gostaria de pedir as mais sinceras desculpas pelos possíveis erros linguísticos que poderão ser encontrados ao longo desta monografia. Foi com muita dificuldade que ultrapassei esta barreira. Assim, a realização deste projeto só fora possível com a contribuição de vários docentes e colegas da Instituição Egas Moniz, pelo que quero deixar o meu profundo agradecimento.

À Professora Zilda Braga Morais, Professora Associada do Instituto Universitário Egas Moniz, um grande obrigado por toda a disponibilidade demonstrada em orientar esta monografia, pela exigência e rigor deste trabalho, pela revisão científica e pelo apoio durante esta etapa conclusiva e importante da minha vida.

À Professora Carla Ascenso, Professora Associada do Instituto Universitário Egas Moniz, um obrigado por toda a disponibilidade e ajuda durante a investigação, todo o apoio e compreensão.

Um enorme obrigado à minha família e à minha Isabel, por todos os sacrifícios e obstáculos que enfrentaram, para que nunca me faltasse nada. Assim, agradeço toda a motivação, todas as palavras e todo o carinho que só eles sabem dar.

Ao pessoal da Galifarma, por realizar com esforço e dedicação as tarefas da empresa que eu deixo ao lado durante estes anos todos.

Agradeço a todos os amigos, colegas e conhecidos que em determinado momento proporcionaram os melhores, anos de ensino e curtição, recordando-me de uma forma especial da Joana, do Leonardo e do Juan Miguel por toda a colaboração.

Agradeço à Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior CRL, pela experiência, rigor e dedicação que demonstra dia após dia, na formação dos seus alunos.

Agradeço ao povo Português por me ter acolhido como um irmão, pelo trato excepcional e pela educação exemplar.

RESUMO

A trombose é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na Europa. O sucesso ao combate das doenças trombóticas necessita de contínuos avanços na investigação dos fármacos antitrombóticos e dos modelos que avaliam a sua eficácia. A terapêutica com antitrombóticos tem como principal objetivo reduzir a ocorrência de trombos, sem aumentar o risco hemorrágico.

Nesta monografia efetuou-se uma revisão da literatura no período 2012-2017, pelos motores de busca Google Scholar e PubMed. Utilizaram-se como principais critérios iniciais de inclusão as publicações com os métodos mais recentes, no entanto, os estudos anteriores ao período desta revisão revelaram-se indispensáveis para a devida compreensão dos modelos atuais. Neste sentido, construiu-se um esquema cronológico da evolução dos modelos de análise da formação trombótica envolvendo nove artigos de referência, de modo a visualizar a inovação na metodologia de estudo dos trombos em modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Em adição, descreveram-se resumidamente os principais passos dos respetivos procedimentos experimentais.

Neste estudo verificou-se que há uma prevalência dos modelos de *in vivo* com animais vertebrados, nos ensaios pré-clínicos, tendo-se historicamente iniciado com os de grande porte, como cães, porcos e coelhos, e, posteriormente, os murinos tornaram-se o modelo mais frequente, uma vez garantida a semelhança com os humanos, a viabilidade económica e a facilidade de manuseamento.

Para os fármacos antiplaquetários e anticoagulantes aprovados no período de 1997 a 2014 foram apresentados os modelos trombóticos utilizados no seu desenvolvimento.

Para ilustrar os métodos mais recentes de análise de fármacos antitrombóticos, foram comentados cinco procedimentos de eficácia utilizados no período 2012-2017. Como critério de inclusão selecionou-se uma substância de origem natural, uma de origem sintética e três novas aplicações de compostos já conhecidos.

Palavras-Chaves: *Antitrombóticos; Modelos de Análises; Métodos Clínicos; Modelos.*

ABSTRACT

Thrombosis is one of the leading causes of morbidity and mortality in Europe. Success in combating thrombotic diseases requires continuous advances in the investigation of antithrombotic drugs and models that evaluate their efficacy. Antithrombotic therapy has as main objective to reduce the occurrence of thrombi, without increasing the hemorrhagic risk.

In this monograph a literature review was carried out in the period 2012-2017, by the search engines Google Scholar and PubMed. The most recent publications were used as the main inclusion criteria, however, studies prior to the period of this review were indispensable for the understanding of current models. In this sense, a chronological schema of the evolution of the thrombotic formation models, involving nine reference articles, was constructed in order to visualize the innovation in the methodology of thrombus studies in *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* models. In addition, the main steps of the respective experimental procedures were briefly described.

In this study it was verified that there is a prevalence of *in vivo* models with vertebrate animals, in the pre-clinical trials, having historically started with the large ones, such as dogs, pigs and rabbits, but now murines are the most frequent ones, once the similarity with humans is guaranteed, economic viability and ease of handling.

For the antiplatelet and anticoagulant drugs approved in the period from 1997 to 2014, the thrombotic models used in its development were presented.

To illustrate the most recent methods of antithrombotic drug analysis, five efficacy procedures used in the period 2012-2017 were commented. As inclusion criterion was selected a substance of natural origin, one of synthetic origin and three new applications of compounds already known.

Keywords: *Antithrombotics; Clinical Methods; Methods of Analysis; Models.*

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE TEXTO.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13

ÍNDICE DE TEXTO

1. Introdução	17
1.1.Enquadramento	17
1.2. Fisiologia do Sistema Hemostático.....	17
1.3. Estados trombóticos	22
2. Métodos de análise e eficácia de fármacos antitrombóticos	25
2.1. Evolução dos modelos trombóticos	25
2.2. Modelos utilizados em fármacos antitrombóticos atualmente aprovados para uso em humanos	29
2.3. Substâncias em estudo para uso farmacêutico em humanos e os modelos utilizados.....	31
2.3.1. Óleo de argão. Efeito antitrombótico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , estudo análise em ratos. (Mekhfi et al., 2012a).....	31
2.3.2. ACT-246475, sintético, antagonista reversível do P2Y ₁₂ (Rey et al., 2017).....	34
2.3.2.1. Método comparativo frente ao ticagrelor da eficácia e risco antitrombótico em ratos.	34
2.3.2.2. Estudo <i>in vivo</i> da trombose provocada por FeCl ₃ , eficácia do ACT-246475 frente a o Ticagrelor.....	35
2.3.2.3. ACT-246475 e ticagrelor, método de estudo comparativo da vasoreatividade na artéria femoral com ratos.	38
2.3.2.4. Monitorização da agregação plaquetária em ratos tratados com ACT-246475 frente a ticagrelor.	40
2.3.3. Derivados de heparina. Modelo de análise para a comparação da atividade anticoagulante, antitrombótica e hemorrágica em fármacos alternativos às heparinas em	

ratos. (Miranda, Nader, Bouças, & Bouças, 2012)	41
2.3.4. Sulforafano. Método de análise <i>in vivo</i> por ADP- trombose pulmonar aguda induzida em ratos (Jayakumar et al., 2013)	45
2.3.5. <i>Limiglidole</i> . Modelo da atividade em Ratos. (Kucheryavenko, Spasov, & Smirnov, 2015)	47

3. Considerações finais, situação e perspectiva sobre os modelos de análise antitrombóticos.....49

4. Bibliografia51

Anexo

- A.1. Modelo intravascular de trombose em cães (Weessler, 1952-62)
- A.2. Método turbidimétrico para seguimento de agregação plaquetária com ADP. (Born, Cross, & Fields, 1963)
- A.3. Modelo de estudo por obstrução parcial de vasos (Folts, Crowell, & Rowe, 1976)
- A.4. Modelo de análise simples para a avaliação de agentes antitrombóticos *in vivo e in vitro* com ratos. (DiMinno & Silver, 1983)
- A.5. Modelo de trombose arterial em ratos induzido por cloreto de ferro. (Grundel et al., 1990)
- A.6. Modelo de trombose arterial em ratos geneticamente modificados com deficiência no fator von Willebrand. (Denis et al., 1998)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos envolvidos na hemóstase primária (retirada de Coelho & Moreira, 2001).....	19
Figura 2. Sistema hemostático. Processo da coagulação, incluindo plaquetas na fase fluida do plasma do sangue, integrado com componentes das células endoteliais vinculado à parede vascular. Muitos componentes da via de fibrinólise também são derivados de células endoteliais. (retirada de Walenga, Ph, Hoppensteadt, & Ph, n.d.).....	21
Figura 3. Formação trombótica. Posteriormente a uma lesão, as plaquetas aderem-se ao colagénio (retirada de Jagadeeswaran et al, 2016).....	22
Figura 4. Distúrbios tromboembólicos arteriais e venosos. Ataque Isquêmico Transitório (TIA); Síndrome Coronária Aguda (ASC); Fibrilação atrial (AF); Doença Arterial Periférica (PAD); Trombose Venosa Profunda (DVT); Embolia pulmonar (PE); (adaptada de Gross & Weitz, 2009).....	24
Figura 5. Estrutura química do ACT-246475 e do ticagrelor (adaptada de Rey et al., 2017).....	34
Figura 6. Fluxo sanguíneo arterial após lesão induzida pelo FeCl ₃ . O máximo de diminuição do fluxo de sangue na presença de veículo foi definida como 100% de redução da velocidade do fluxo sanguíneo. Efeitos do ACT-246475 (Painel A) e ticagrelor (Painel B) são expressos em % variação na velocidade do fluxo sanguíneo carotídeo em relação ao fluxo basal. ACT-246475 e ticagrelor foram dissolvidas em PEG 400 (7,5% v/v), PG (7,5% v/v), o Cremofor (5% v/v) (Chremophor EL, Fluka N°27963, Buchs, Suíça), em tampão fosfato pH = 7,4 a uma concentração de 1 mg/mL. Veículo: PEG 400 (7,5%), PG (7,5%), o Cremofor (5%) tampão fosfato, pH = 7,4. Os dados estão apresentados como médias, n = 9-35 (adaptada de Rey et al, 2017).....	36

Figura 7. Relaxamento da artéria femoral precontraída. Relaxamento da artéria femoral isolada do rato para ACT-246475 (círculos brancos) e ticagrelor (círculos pretos). Anéis de artéria femoral foram precontraídos com $1 \mu\text{mol/L}$ U46619, e incrementadas as concentrações dos dois antagonistas dos recetores P2Y12 foram adicionados para o órgão. Os dados estão apresentados como médias \pm SEM, $n = 4-6$. $^{***}P < 0,01$ (adaptada de Rey et al, 2017).....39

Figura 8. Prevenção da contração da artéria femoral de ratos por aplicação de de campo elétrico de estimulação. Efeitos do ACT-246475 ticagrelor (A) e (B) na contração da artéria femoral de ratos por Estimulação de Campo Elétrico. Contração observada no primeiro controle de resposta 24 Hz foi definido como 100%. Controle: círculos aberto, estudo de drogas: círculos pretos e quadrados brancos. Os dados estão apresentados como médias SEM, $n = 4-6$. $^{*}P < 0,05$; $^{P} < 0,01$ ** (adaptada de Rey et al, 2017).....40

Figura 9. Prevenção da contração da artéria femoral à fenilefrina. Efeitos do ACT-246475 (A) e ticagrelor (B). Controle: círculos abertos, drogas: círculos pretos e quadrados brncos. Os dados estão apresentados como médias \pm SEM, $n = 4$. $^{*}P < 0,05$, $^{**} P < 0,01$; $^{P} < 0,0001$ **** prasugrel (Retirada de Rey et al, 2017).....40

Figura 10. Caracterísitcas farmacológicas dos compostos semelhantes à heparina e outras drogas antitrombóticas (retirada de Miranda, Nader, Bouças, & Bouças, 2012).....44

Figura 11. A influência de sulforafano no prolongamento do tempo de oclusão para induzir a formação de trombo em vênulas mesentérico de ratos. (A e B) foram administrados 0,5% DMSO (CTL) ou sulforafano (0,125 e 0,25 mg/kg) após o qual vênulas mesentéricas foram selecionadas para irradiação para induzir a formação de microtrombos. Os dados do gráfico de barras em (A) correspondem à média e desvio padrão do tempo de oclusão (em segundos, s) para induzir a formação de tampão plaquetário ($n=5$). $^{*}P < 0,05$ em comparação com o grupo de controlo. As imagens microscópicas em (B) foram tomadas de amostras tratadas com solução controlo (a, b) e solução de sulforafano (0,25 mg/kg) (c, d). Os tempos das imagens correspondem a 5 s (a, c) e 110 s (b, d) após a irradiação. As fotografias são exemplos representativos de

Figura 12. Efeitos do sulforafano na inibição da agregação plaquetária, perante $[Ca^{2+}]$ Mobilização, e FITC-triflavín vincutivo para a integrina

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos fatores da coagulação por ordem de descoberta (adaptada de Larini, 2008; Seeley et al, 2003).....	20
Tabela 2. Causas de morte. Taxa de mortalidade padronizada, 2014 (adaptada de Eurostat).....	24
Tabela 3. Modelos de estudos trombóticos por mecanismo e tipo de vaso realizados em murinos (adaptada de Jagadeeswaran et al, 2016).....	27
Tabela 4. Modelos de peixe zebra geneticamente modificados utilizados em ensaios trombóticos (adaptada de Jagadeeswaran et al, 2016).....	28
Tabela 5. Esquema cronológico da evolução de modelos de análise da formação trombótica.....	29
Tabela 6. Modelos trombóticos utilizados no desenvolvimento de fármacos antiplaquetários aprovados.....	30
Tabela 7. Modelos trombóticos utilizados no desenvolvimento de fármacos anticoagulantes aprovados.....	30
Tabela 8. Efeito do óleo de argão no tromboembolismo pulmonar agudo em camundongos (adaptada de Mekhfi et al., 2012a).....	32
Tabela 9. Quantificação de trombos ricos em plaquetas (retirada de Rey et al, 2017).....	37
Tabela 10. Principais características de compostos similares à heparina e fármacos antitrombóticos (retirada de Miranda et al, 2012).....	42
Tabela 11. Características farmacológicas dos compostos semelhantes à heparina e outras drogas antitrombóticas (retirada de Miranda et al, 2012).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ADP – Adenosina Difosfato

AIT – Ataque Isquémico Transitório

AMP – Adenosina Monofosfato

AMPLIFY – *Apixaban for the Initial Management of Pulmonary Embolism and Deep-Vein Thrombosis as First-line Therapy*

APC – Proteína C ativada

AT – Antitrombina

ATIII – Antitrombina III

ATL – Agregómetro de Transmissão de Luz

ATP – Adenosina Trifosfato

AVK – Antivitamínicos K

cDNA – DNA complementar

DAP – Doença Arterial Periférica

DMSO – Dimetilsulfóxido

Dv – Diâmetro do Vaso

ECE – Estimulação de Campo Elétrico

ECG – Eletrocardiograma.

EDTA/AEDT – Ácido Etilenodiaminotetraacético

EINSTEIN – *Evaluating Oral, Direct Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban in Patients with Acute Symptomatic DVT or PE*

EP – Embolia Pulmonar

FA – Fibrilhação Atrial

FT – Fator tecidual

FvW – Fator de vonWillebrand

HBPM – Heparinas de Baixo Peso Molecular

ICR – Injeção na Veia Caudal de Ratos

INR – *International Normalized Ratio*

PAI-1 – Inibidor do Ativador de Plasminogênio

PBS – Fosfato Salino

PC – Proteína C

PGI – Prostaglandina

PI-88 – Fosfossulfomanana

PPP – Plasma Pobre em Plaquetas

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PS – Proteína S

RBC – Glóbulos Vermelhos

RE-COVER – *Efficacy and Safety of Dabigatran Compared to Warfarin for 6 months Treatment of Acute Symptomatic VTE*

RVV-Xa – Factor X Purificada do Veneno de Víbora de Russell

SCA – Síndrome Coronário Agudo

TAF1 – Inibidor da Fibrinolise Ativado pela Trombina

TAF1a – Forma Ativa do TAF1

TEV – Tromboembolismo Venoso

TF – Factor Tecidual

TFPI – Inibidor da Via do Factor Tecidual

TMO – Tempo Medio de Oclusão

TP – Tempo de Protrombina

tPA – Tempo de Protrombina

TPA – Tromboembolismo Pulmonar Agudo

TT – Tempo de Trombina

TTO – Tempo Médio de Oclusão

TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

TT-T-30 – Teflon T-Medidor de Termopar tipo 30

TVP – Trombose Venosa Profunda

TXA2 – Tromboxano A2

UI – Unidades Internacionais

USP – *United Stated Pharmacopea*

1. Introdução

1.1. Enquadramento

O objetivo deste trabalho foi compilar e comentar os principais procedimentos utilizados em testes clínicos aquando da avaliação de fármacos antitrombóticos.

A revisão da literatura foi realizada através dos motores de busca Google Scholar e PubMed. A abordagem inicial fez-se pelas palavras-chave *antithrombotic methods* e *antithrombotic trials*. Para o intervalo de tempo «desde sempre», o Google Scholar forneceu 64 e 220 publicações, respetivamente; a afinação para o período 2012-2017 levou a 15 e 89 resultados, respetivamente. A subsequente leitura e seleção das publicações teve como principais critérios de inclusão os estudos com alguma contribuição na realização das técnicas *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* e os testes mais recentes para a medição de processos tromboticos e da eficácia de substâncias com atividade antitrombótica, que estão atualmente em estudo.

Esta pesquisa levou a um esquema cronológico da evolução dos modelos tromboticos (Tópico 2.1, Tabela 5); a descrição dos procedimentos utilizados nestes modelos foi inserida no anexo, a seguir à bibliografia. Em relação a dez fármacos antitrombóticos atualmente aprovados, construíram-se duas tabelas, consoante tratar-se de fármacos antiplaquetários ou anticoagulantes, nas quais inseriram-se as características dos modelos tromboticos utilizados no seu desenvolvimento (Tópico 2.2, Tabelas 6 e 7). No que respeita às substâncias atualmente em estudo, foram selecionadas uma de origem natural, uma de origem sintética e três novas aplicações de compostos já conhecidos, e, para estas, apresentaram-se as metodologias publicadas de estudo antitrombótico (Tópico 2.3).

Com o intuito de situar e esclarecer a temática desta dissertação, apresenta-se a seguir uma breve introdução sobre a fisiologia do sistema hemostático (Tópico 1.2) e dos estados tromboticos (Tópico 1.3).

1.2. Fisiologia do Sistema Hemostático

O sistema hemostático protege o sistema vascular e permite que os tecidos sejam reparados, quando existe uma lesão, reestabelecendo assim as suas funções. É um dos mecanismos básicos do organismo, responsável pela preservação da integridade da

circulação, uma vez que limita a perda de sangue. A sequência de reações locais que culmina no controlo da hemorragia a partir de um vaso lesado, denomina-se de hemóstase e é regulada por diferentes mecanismos, dividindo-se em três fases: resposta vascular (constricção do vaso lesado), hemóstase primária (formação do trombo plaquetário) e a hemóstase secundária (formação do coágulo de fibrina) (Coelho & Moreira, 2001).

Resposta Vascular

Quando um vaso é lesado, dá-se uma constricção como resposta imediata. Esta resposta é transitória, permitindo a redução do fluxo sanguíneo na área afetada e a manutenção das superfícies endoteliais justapostas. Esta resposta apenas se mostra eficiente nos pequenos vasos da microcirculação e, quando ocorre, pode colapsá-los e obstruir o fluxo de sangue através deles (Seeley, Stephens & Tate, 2003; Coelho & Moreira, 2001).

Durante a formação do trombo plaquetário, as plaquetas libertam tromboxanos - um potente vasoconstritor - que deriva de prostaglandinas e endotelina. A vasoconstricção atenua as perdas hemorrágicas dando algum tempo para que o trombo plaquetário se possa formar no local da lesão; a redução do calibre dos pequenos vasos e o aumento da força de contração aumentam as reações das plaquetas (Seeley et al., 2003).

Hemóstase Primária

O processo de formação do tampão plaquetário nos locais de lesão vascular é denominado de hemóstase primária. Este fenómeno ocorre poucos segundos após a lesão e é extremamente relevante na limitação da perda de sangue por parte dos capilares, arteríolas e vénulas. Uma hemóstase primária eficaz envolve os processos de adesão, agregação, ligação e consolidação plaquetária, como mostra a (Figura 1) (Coelho & Moreira, 2001).

Em condições normais, as plaquetas apresentam-se lisas, discóides e, embora viscosas, não aderem à superfície endotelial íntegra localizada na parede vascular, acabando por não se ligar entre si. Após a lesão vascular, poucos segundos depois, as plaquetas ficam mais esféricas, com saliências citoplasmáticas longas e irregulares, aderindo ao colagénio do subendotélio vascular, através de recetores plaquetários específicos. A principal

ligação ocorre entre as fibrilas de colagénio e a glicoproteína Ib/IX e é estabilizada pelo Fator de vonWillebrand (FvW), que funciona como uma ponte entre elas, permitindo que as plaquetas se mantenham aderidas ao vaso. A glicoproteína IIb/IIIa junta-se ao fibrinogénio e ao FvW e exerce um papel essencial na agregação e adesão das plaquetas. A ligação das plaquetas ao colagénio leva à libertação do conteúdo das suas vesículas secretoras, como a serotonina e a Adenosina Difosfato (ADP), que atuam localmente, induzindo alterações estruturais e funcionais nas plaquetas. Este processo é denominado ativação plaquetária, pois estimula a produção de novas plaquetas recrutando-as para o local da lesão, onde o FvW e o fibrinogénio solidificam as interações entre as mesmas. A adesão das plaquetas induz a síntese de Tromboxano A2 (TXA2), que é libertado no fluído extracelular, estimulando a agregação plaquetária e a libertação do conteúdo das vesículas secretoras. Ocorre assim um fenómeno de retroalimentação positiva que origina, ligeiramente, um agregado de plaquetas dentro do vaso (Coelho & Moreira, 2001; Larini, 2008; Seeley et al., 2003).

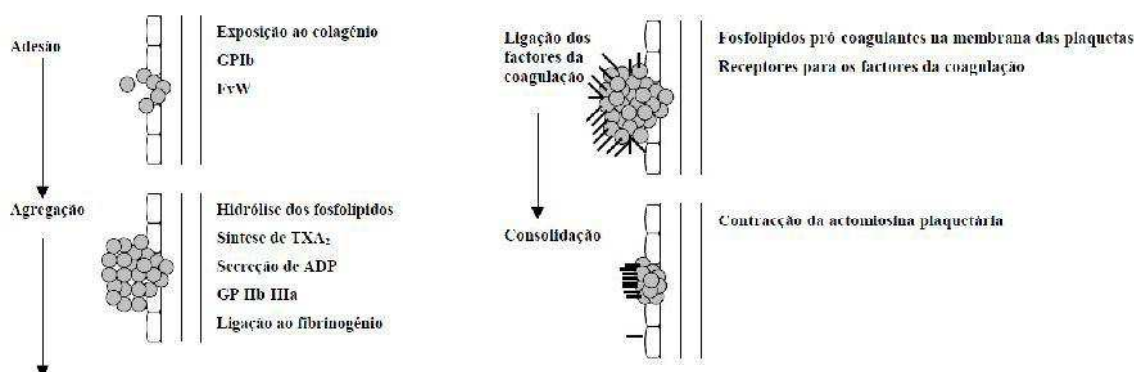


Figura 1. Principais mecanismos envolvidos na hemóstase primária (retirada de Coelho & Moreira, 2001).

Hemóstase secundária

A coagulação sanguínea, também designada por hemóstase secundária, baseia-se numa cascata enzimática complexa na qual os componentes são ativados por proteólise e cujo produto final é a fibrina, que forma a base do coágulo sanguíneo (Staton & Lewis, 2005). A coagulação é um processo que resulta da ativação sequencial de uma série de proteínas plasmáticas, que interagem entre si, e da formação de complexos membranares com a participação de iões de cálcio.

As proteínas que intervêm neste processo são denominadas de fatores de coagulação e encontram-se no plasma nas suas formas inativas (Coelho & Moreira, 2001). Os fatores

de coagulação foram classificados através de numeração romana, pela ordem pela qual foram descobertos (Tabela 1). Esta numeração refere-se aos precursores inativos dos fatores de coagulação, sendo a forma ativa desses fatores referida pelo sufixo “a” colocado imediatamente a seguir ao algarismo romano (Larini, 2008).

Tabela 1. Classificação dos fatores da coagulação por ordem de descoberta (adaptada de Larini, 2008; Seeley et al, 2003).

<i>Fator</i>	<i>Nome</i>	<i>Descrição e Função</i>
<i>I</i>	Fibrinogénio	Proteína plasmática sintetizada no fígado; Precursor da fibrina.
<i>II</i>	Protrombina	Proteína plasmática sintetizada no fígado; Precursor da trombina, a qual converte o fibrinogénio em fibrina; é dependente da vitamina K.
<i>III</i>	Tromboplastina	É uma lipoproteína presente na membrana de certas células; liga-se ao fator VII, iniciando a coagulação <i>in vivo</i> .
<i>IV</i>	Ião cálcio	Cofator em todo o processo da cascata da coagulação.
<i>V</i>	Proacelerina	Proteína plasmática sintetizada no fígado; co-fator da reação que transforma a protrombina em trombina.
<i>VI</i>	Proconvertina	Proteína plasmática sintetizada no fígado; dependente da vitamina K; Liga-se ao fator tecidual (FT), formando o complexo enzimático VIIa/FT/Ca ²⁺ , o qual ativa os fatores IX e X.
<i>VII</i>	Fator Anti Hemofílico	Proteína plasmática sintetizada nos megacariócitos e nas células endoteliais; Ativado é cofator do fator IXa no complexo que ativa o fator X.
<i>VIII</i>	Fator Christmas	Proteína sintetizada no fígado; fator dependente da vitamina K; este fator ativado funciona como enzima no complexo que ativa o fator X.
<i>IX</i>	Fator Stuart-Prower	Proteína plasmática sintetizada no fígado; fator dependente da vitamina K; este fator ativado funciona como enzima no complexo que ativa a protrombina.
<i>X</i>	Precursor da tromboplastina plasmática	Proteína plasmática sintetizada no fígado; circula complexado com o HMWK (cininogénio de alto peso molecular).
<i>XI</i>	Fator Hageman	Ativado por contacto de superfície ou pela calicreína.
<i>XII</i>	Fator estabilizador da fibrina	Proteína existente no plasma e nas plaquetas; Ativado pela trombina forma ligações peptídicas entre as moléculas de fibrina ajudando a estabilizar o coágulo.

A cascata de coagulação clássica inclui a via intrínseca, ou de contacto, e a via extrínseca. Na via intrínseca, todos os fatores necessários se encontram em circulação e a reação inicial é estimulada pelo contacto com superfícies negativas. A via extrínseca é ativada no seguimento de uma lesão vascular. Após ativação do fator X, as vias intrínseca e extrínseca confluem numa só via que culmina na formação de trombina, como mostra a figura 2 (Coelho & Moreira, 2001; Macedo, 2006).

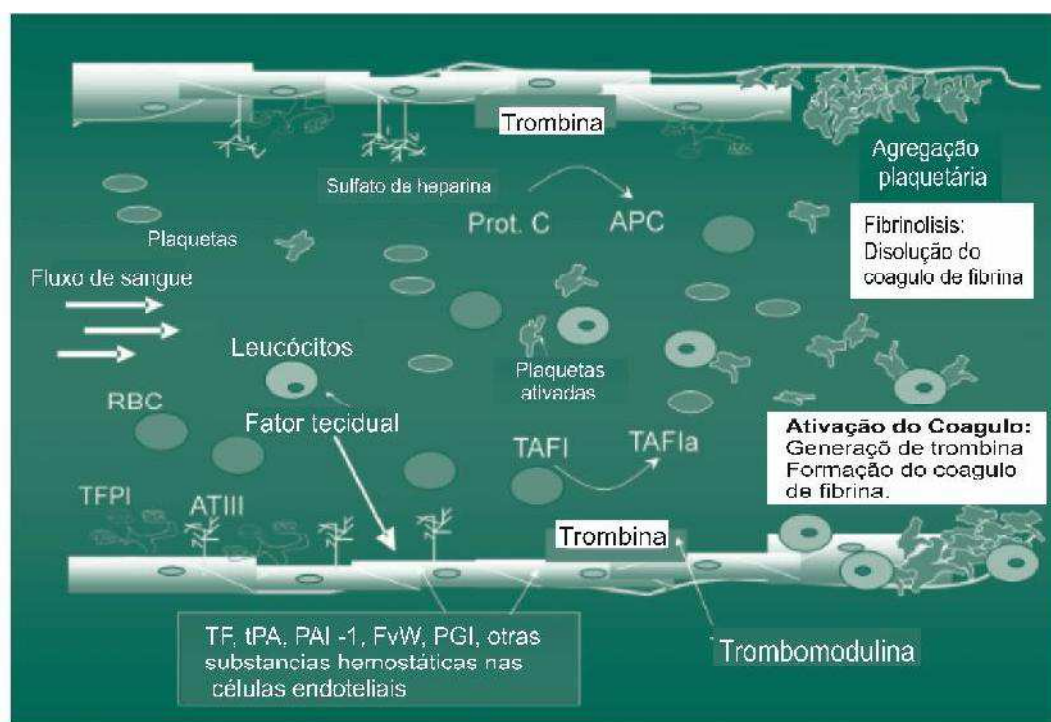


Figura 2. Sistema hemostático. Processo da coagulação, incluindo plaquetas na fase fluida do plasma do sangue, integrado com componentes das células endoteliais vinculado à parede vascular. Muitos componentes da via de fibrinólise também são derivados de células endoteliais. (Adaptado de Walenga et al., n.d.)

Mecanismos de regulação

Existem mecanismos, denominados mecanismos de regulação, que se opõem à formação do coágulo, limitando o processo e impedindo que este se propague excessivamente. Estados de hipercoagulabilidade estão associados a falhas nestes mecanismos de regulação da hemóstase (Widmaier et al., 2014). Os inibidores fisiológicos mais importantes são a Antitrombina (AT), Proteína C (PC), Proteína S (PS) e o inibidor da via do fator tecidual, mecanismo anticoagulante que atua numa fase mais precoce da coagulação e que se liga ao complexo FT/FVIIa inibindo a capacidade deste atuar no fator X (Wu & Thiagarajan, 1996; Widmaier et al., 2014).

A AT é o principal inibidor circulante da coagulação: inativa diretamente a trombina e as outras protéases de serina (fatores IXa, Xa, XIa, XIIa), plasmina e calicreína (Coelho & Moreira, 2001).

A PC é ativada pela trombina, após a ligação desta à trombomodulina que se encontra nas superfícies endoteliais intactas. A PC ativa, vai inativar os fatores Va e VIIIa, bem como os recetores plaquetários para o FXa. A PS é, tal como a PC, uma proteína dependente da vitamina K sendo que, a sua forma livre atua como cofator da PC ativada, juntamente com fosfolípidos pró-coagulantes (Coelho & Moreira, 2001; Larini, 2008).

1.3. Estados trombóticos

A trombose constitui a alteração mais frequente no processo hemostático e refere-se à formação de uma massa anormal no lúmen vascular (Figura 3), a partir dos componentes sanguíneos, envolvendo fatores vasculares, celulares e humorais (Coelho & Moreira, 2001; Larini, 2008).

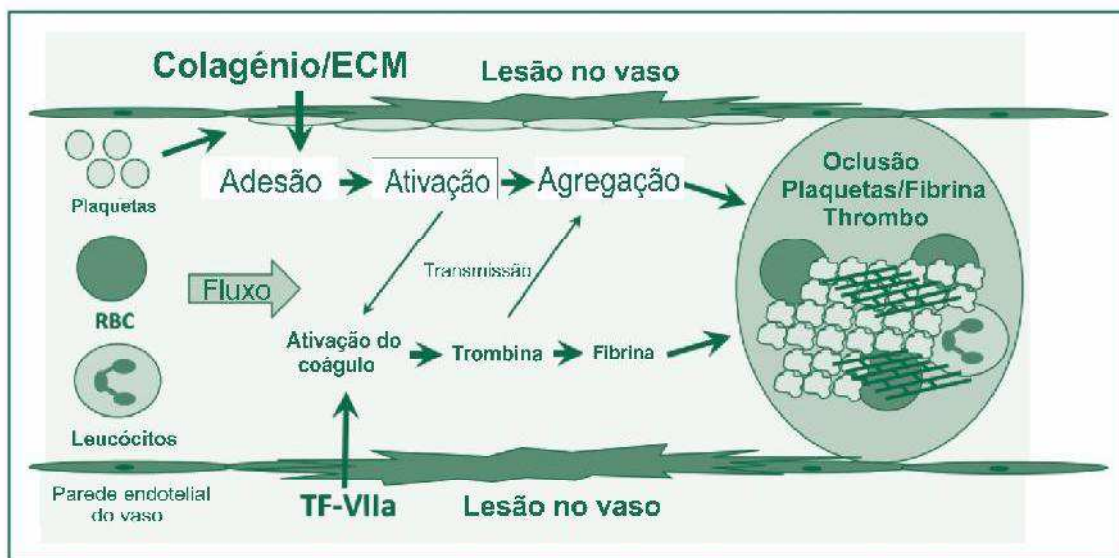


Figura 3. Formação trombótica. Posteriormente a uma lesão, as plaquetas aderem-se ao colagénio (adaptada de Jagadeeswaran et al, 2016).

A investigação realizada por Virchow, em 1856, demonstrou os três principais fatores que contribuem para o aumento do risco trombótico, nomeadamente a estase venosa, as alterações na parede vascular (lesão endotelial) e a hipercoagulabilidade (Kumar, Hanlin, Glurich, Mazza & Yale, 2010). Este conjunto é conhecido como tríade de Virchow e constitui atualmente a base para a avaliação dos fatores de risco do tromboembolismo, cuja

causa, na maioria das vezes é multifatorial (Bayer, 2015).

As patologias trombóticas podem ocorrer no sistema venoso, de baixo fluxo e baixa pressão, ou no sistema arterial, de alto fluxo e alta pressão. Existem diferenças básicas entre a trombose arterial e a trombose venosa, nomeadamente a composição do trombo e a presença de lesão na parede vascular (Lane & Grant, 2000).

Os três fatores de Virchow não assumem a mesma função na trombose arterial e venosa. Na trombose arterial, as alterações na parede vascular são predominantes, devido à elevada pressão do fluxo sanguíneo nas artérias. Assim, a estase não confere um elevado risco e a hipercoagulabilidade do sangue tem um papel relativamente menor, ao contrário do que acontece na trombose venosa (Versteeg et al., 2013).

O processo da hemóstase deriva de um balanço subtil entre a coagulação e a fibrinólise. O distúrbio deste equilíbrio, tanto por fatores genéticos como adquiridos, leva a complicações trombóticas e hemorrágicas.

A trombose corresponde à formação de um trombo que se pode localizar na circulação arterial e/ou venosa. A sua localização vai influenciar a natureza do trombo: quando se localiza no sistema venoso, o trombo é constituído maioritariamente por fibrina, eritrócitos e algumas plaquetas, ao passo que, quando se localiza no sistema arterial, o trombo apresenta um elevado número de plaquetas. As características do vaso vão influenciar o tipo de agentes usados e os seus alvos celulares. As plaquetas exercem um papel importante na hemóstase que, a nível arterial, pode ocorrer após a rotura, fissura ou erosão da placa de ateroma, com exposição e libertação de fatores trombogénicos e adesão das plaquetas. Na veia, a trombose ocorre através da ativação da cascata de coagulação (Davì & Patrono, 2007). O tromboembolismo (Figura 4), relacionado com a circulação arterial ou venosa, ou decorrente de causa cardíaca, é responsável pela maioria dos episódios cardiovasculares fatais ou não fatais (Eikelboom & Weitz, 2010).

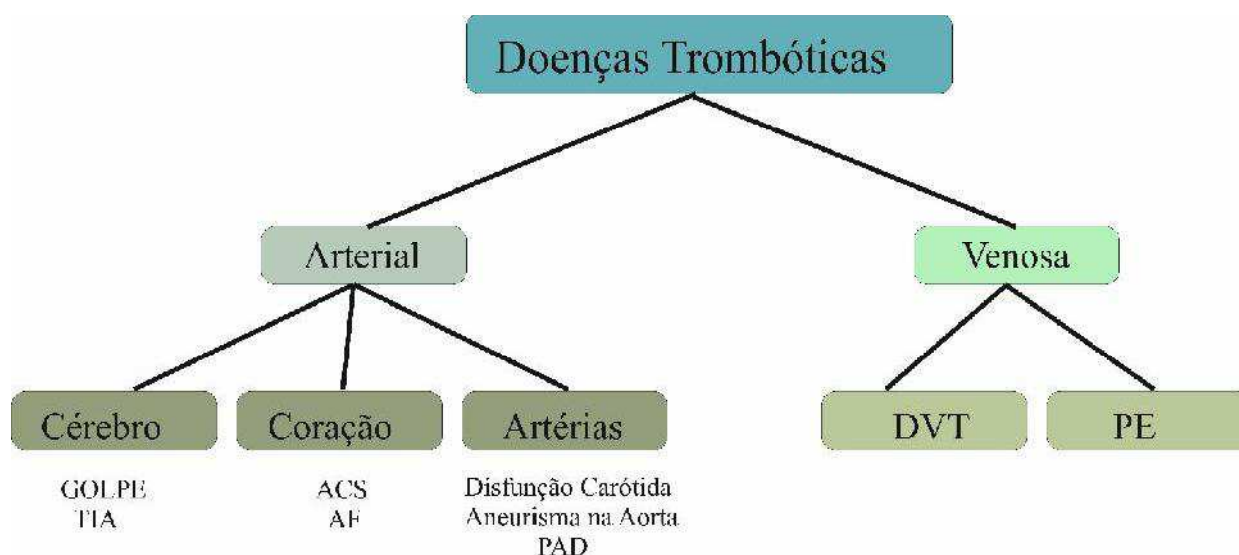


Figura 4. Distúrbios tromboembólicos arteriais e venosos. Ataque Isquêmico Transitório (TIA); Síndrome Coronária Aguda (ASC); Fibrilação atrial (AF); Doença Arterial Periférica (PAD); Trombose Venosa Profunda (DVT); Embolia pulmonar (PE); (adaptada de Gross & Weitz, 2009).

O desenvolvimento de doenças trombóticas é a principal causa de morbidade e mortalidade na Europa (Sikka & Bindra, 2010). A tabela 2 mostra os dados referentes a 2014.

Tabela 2. Causas de morte por país. Taxa de mortalidade padronizada, 2014 (por 100.000 habitantes) (adaptada de Eurostat, 2013).

	Doenças Circulatórias	Doenças Cardiovasculares	Cancro	Cancro de Cólon	Cancro Colorectal	Doenças Sistema Respiratório	Doenças Sistema Nervoso	Acidentes de trânsito	Suicídio	Cancro de mama	Cancro de cervix	Cancro do útero
EU-28 (*)	373.6	126.3	261.5	54.4	30.5	78.3	38.6	5.8	11.3	32.6	3.9	6.6
Belgium	261.9	72.4	252.6	61.6	26.1	95.7	46.5	6.7	17.3	37.0	2.7	6.4
Bulgaria	1 131.0	195.4	242.4	45.5	34.9	58.1	15.3	9.0	9.9	32.6	8.7	9.0
Czech Republic	615.2	333.1	284.6	53.1	37.9	73.4	30.8	7.8	14.4	29.1	5.7	8.0
Denmark	256.6	81.0	300.6	71.7	35.2	115.7	42.9	4.0	11.9	39.7	3.6	6.1
Germany	403.5	142.8	253.2	51.0	29.0	68.0	29.6	4.6	11.9	35.6	3.2	4.9
Estonia	699.6	295.5	299.4	55.3	38.0	43.8	21.8	7.5	18.3	31.8	8.6	5.9
Ireland	309.9	147.5	288.3	61.5	32.4	125.9	48.7	4.0	11.0	41.2	5.0	7.8
Greece	361.4	103.0	249.3	61.9	23.3	108.1	20.9	8.6	5.0	31.0	2.3	5.9
Spain	245.0	68.2	232.7	47.8	33.6	91.7	48.5	4.3	8.2	23.7	2.3	6.2
France	202.9	49.3	245.4	50.1	26.1	52.0	50.2	5.1	14.1	32.9	2.2	7.4
Croatia	678.6	306.5	336.4	65.2	51.0	59.7	21.3	8.9	16.8	44.5	5.5	11.1
Italy	310.1	98.3	246.6	49.4	27.0	68.3	34.3	5.6	6.3	31.7	1.3	6.6
Cyprus	351.8	108.7	201.0	37.2	16.7	86.2	26.8	6.5	4.5	26.6	1.5	9.2
Latvia	882.7	442.7	299.3	46.9	34.2	35.9	15.6	12.4	19.0	34.6	9.5	9.5
Lithuania	848.8	564.4	276.2	46.1	32.1	42.1	20.8	10.7	31.5	28.5	10.4	8.4
Luxembourg	296.9	80.3	260.7	59.6	25.5	63.8	38.0	6.0	13.4	35.6	3.2	6.3
Hungary	761.5	390.6	348.1	89.8	55.0	78.6	19.9	8.1	19.4	37.9	7.6	8.2
Malta	372.4	202.8	233.5	43.2	28.3	90.0	21.0	2.5	8.3	35.1	1.8	12.7
Netherlands	271.7	62.4	282.2	66.7	32.9	74.1	48.3	4.1	11.1	35.2	2.4	5.9
Austria	418.1	179.1	249.3	47.5	26.4	46.6	32.6	5.8	15.3	32.4	3.4	5.5
Poland	591.4	129.1	292.3	69.2	36.0	69.1	16.5	10.3	15.5	31.0	8.3	8.0
Portugal	305.8	69.6	242.1	36.4	35.0	116.7	32.8	7.8	11.3	26.7	3.5	6.4
Romania	951.3	320.3	273.2	54.2	32.4	78.4	21.0	12.3	11.4	32.1	16.4	6.0
Slovenia	451.3	102.8	299.9	58.6	38.4	66.3	21.1	6.7	18.9	33.5	4.4	9.3
Slovakia	654.6	388.8	324.1	50.0	49.2	74.9	29.5	8.5	10.8	35.8	8.7	9.9
Finland	378.8	199.2	218.6	39.0	22.6	34.4	155.0	5.7	14.6	26.6	1.8	6.1
Sweden	338.3	131.2	234.8	38.7	29.2	58.1	42.6	3.4	12.1	27.0	2.6	6.3
United Kingdom	264.9	118.4	278.4	61.4	27.7	130.9	47.6	2.8	7.1	34.7	2.8	6.7
Liechtenstein	296.4	73.7	203.0	31.3	6.8	89.8	67.6	10.3	10.2	41.0	.	9.9
Norway	272.6	95.7	252.5	50.5	36.4	88.4	45.4	4.0	7.3	27.2	2.7	7.2
Switzerland	280.0	97.8	219.6	42.1	22.8	51.3	44.5	3.6	12.8	31.1	1.4	5.1
Serbia	931.6	159.5	298.3	69.4	37.2	79.7	27.3	7.6	15.9	41.9	10.4	8.0
Turkey (*)	2.2	4.2

2. Métodos de análise de eficácia de fármacos antitrombóticos

2.1. Evolução dos modelos trombóticos

O problema das doenças trombóticas vem sendo estudado de modo sistemático pelo menos desde o século XX. Utilizando cães, a série de estudos da equipa liderada por Wessler, e publicada no período de 1952 a 1962 (Wessler & Connelly, 1952; Wessler, 1962) introduziu importantes inovações, através da medição dos tempos de coagulação e da composição dos coágulos. Entre outros avanços, relataram que o processo de coagulação *in vivo* foi mais lento que o estudado com modelo *in vitro* e descreveram a fibrina como o principal composto encontrado nos trombos (Anexo 1).

Seguindo a Wessler et al, no ano 1962, Gustav Born publicou um estudo de modelo trombótico utilizando ADP como agente desencadeador (Anexo 2). Este modelo iniciou uma importante linha de investigação: em fevereiro de 2018 o artigo tinha mais de cinco mil citações no Google Scholar.

Logo em 1976, Folts, Crowell e Rowe descreveram um modelo de lesão arterial que envolveu 60% a 80% de estenose da artéria coronária de cães. Neste artigo, procederam à administração de ácido acetilsalicílico (AAS), o qual aboliu as reduções cíclicas do fluxo sanguíneo e reduziu a agregação plaquetária (Anexo 3). O trabalho de Folts et al constituiu um marco importante para os métodos laboratoriais e para a terapia antitrombótica. Seguindo neste caminho, modelos similares foram posteriormente aplicados em outras espécies, incluindo coelhos, ratos e camundongos. O modelo Folts et al aproximou-se da trombose arterial clínica. De referir também o shunt arteriovenoso, modelo que utiliza uma superfície sintética para simular a formação de trombo num circuito que passa de pressão arterial a pressão venosa; em contrapartida, tem pouca relevância para estudos das formas de trombo fisiopatológicos.

No ano de 1983, foi sugerido um método simples de chegar à formação do trombo para o ensaio clínico de agentes antitrombóticos: DiMinno e Silver publicaram um estudo realizado em ratos com a aplicação de colagénio e epinefrina como principal agente detonador da formação do trombo. Este estudo, com duas partes definidas que tratam os modos *in vitro* e *in vivo*, mediu a capacidade antitrombótica obtida pelo AAS em combinação com o etanol (Anexo 4). Uma vez constatada a qualidade deste modelo em

ratos, houve uma grande adesão e muitas publicações basearam-se neste modelo. Desde o início da década de noventa, tornou-se habitual a utilização de ratos nos testes tromboticos. Muitos fatores contribuíram para a generalização destes animais nos biotérios, seja por causas económicas, de praticidade, de logística ou sociais (Jagadeeswaran, Cooley, Gross & Mackman, 2016; Yunta, 2007).

Na revisão sobre os métodos de análise e estudos realizados em fármacos para a terapêutica antitrombótica, os trabalhos de Folts et al (1976) e DiMinno e Silver (1983) destacaram-se como os principais pontos de partida. Apesar dos avanços alcançados desde então, estes estudos são ainda uma referência nas técnicas que hoje em dia são realizadas para comprovar a efetividade de fármacos antitrombóticos, como se vai demonstrar nos diversos modelos referidos nesta monografia.

Um novo passo importante para descrição da composição do trombo e o desenvolvimento novas drogas ocorreu em 1990, na publicação de Kurz, Main & Sandusky, em que foi detalhado o estudo da trombose, em ratos, provocada por uma solução de cloreto de ferro III junto com a aplicação de um par termoelétrico (Anexo 5). A utilização do FeCl_3 revelou-se económica, fácil de aplicar e adequada para o conhecimento da formação trombotica; por estas características tornou-se numa opção habitual nos laboratórios que trabalham neste campo.

No final do século vinte, com as diversas transformações sociais e tecnológicas, a atividade laboratorial com animais foi repensada com vista a limitar (Romero-Fernandez et al., 2016) o número seres afetados e o sofrimento aplicado. Assim, no ano 1998, foi proposto um modelo com ratos geneticamente modificados, respondendo às limitações impostas e com a intenção de obter resultados mais rápidos nos processos de desenvolvimento de fármacos. Este novo modelo, com origem em Harvard (Denis et al., 1998), manteve o uso de FeCl_3 como indutor dos trombos, mas os ratos passaram a ser clonados com um defeito na hemóstase que provoca hemorragias para simular a doença humana por falta de FvW. Esta modificação foi muito significativa, devido à simplificação das provas, aportando também resultados mais comparáveis nos diversos indivíduos utilizados (Anexo 6).

Com vista a ilustrar de forma sistemática os detalhes que vários autores adotaram em métodos trombóticos com murinos, nomeadamente o local da lesão, a forma e o mecanismo de indução, Jagadeeswaran et al (2016) compuseram uma tabela que se reproduz a seguir (Tabela 3).

Tabela 3. Modelos de estudos trombóticos por mecanismo e tipo de vaso realizados em murinos (adaptada de Jagadeeswaran et al, 2016)

Vasos	Dano/ Indução Trombótica	Mecanismo Específico	Referências
Arteria			
Carótida	Lesão Radicais livres	Cloreto de Ferro	Farrehi et al , 1998
Carótida	Lesão Radicais livres	Rosa bengala + Luz	Eitzman et al , 2000
Carótida	Lesão Radicais livres	Electrolise com iões de ferro	Cooley , 2011
Carótida	Mecânica	Pitada	Mangin et al , 2006
Carótida	Mecânica	União pequena e dura	Schulz et al , 2008
Carótida	Mecânica	Hilo endotelial / ferimento necessário	Cornelissen et al , 2010
Carótida	Mecânica	Ultra-som	Kuijpers et al , 2009
Carótida	Colagénio intraluminal	Superfície de Colageno Advential	Cooley , 2013
Carótida	Calor	Cauterização	Carmeliet et al , 1997
Carótida	Anastomoses	Sutura reparadora	2011 Cooley & Daley , 1999
Veias			
Veia Cava Inferior	Estase	Veia Cava Inferior ligação	Myers et al , 2003
Veia Cava Inferior	Baixo fluido	Veia Cava Inferior estenose	Singh et al , 2003
Veia Cava Inferior	Baixo fluxo + Lesão mecânica leve	Veia Cava Inferior estenose + breve ferimento na braçadeira	Singh et al , 2002
Veia Cava Inferior, Safrena, Jugular	Lesão Radicais livres	Cloreto de ferro	Wang et al , 2006
Veia Cava Inferior, femoral	Lesão Radicais livres	Calor / Fotoquímica	Cooley , 2011 Daley et al , 1999
Microvasos			
Cremasterica ou Mesenterica	Lesão Radicais livres	Cloreto de ferro	Denis et al , 1998
Cremasterica ou Mesenterica	Laser	Calor / Fotoquímica	Falati et al , 2002

Desde o início do século XXI, surgiram modelos apoiados em técnicas mais atuais, nos quais constata-se a influência das comunicações de hoje em dia. Neste contexto, no ano 2013 foi apresentado um modelo *in vivo*, em ratos, desenvolvido em Taiwan, pelo método de indução de trombos em microvasos por radiação e comparação de resultados com ajuda de fluorescência, depois de uma administração por bolus de um corante (Jayakumar et al., 2013) (Tópico 2.3.4). Esta técnica veio gerar de forma mecânica o efeito trombótico que se deseja em vasos de calibre pequeno o qual, até então, pela maneira como era aplicado, não resultava tão eficaz.

Aqui pode-se constatar que, com o avançar da tecnologia, os modelos evoluem para formas mais complexas.

Um novo estudo, publicado em 2014 por Adelman et al, efetuado *in vitro* e *ex vivo* com amostras de humanos comparou a efetividade do Apixaban e do Rivaroxaban por meio da tromboemblastometria rotacional. O trabalho permitiu estabelecer parâmetros de semelhança com a trombose clínica. Este método analisa o fator tecidual assim como o tempo de coagulação ativado permitindo medir o efeito do fármaco numa possível triagem pré-operatória (Adelman et al, 2014).



















Na sequência da tendência de utilização de animais aquáticos em ensaios farmacêuticos, no ano 2016, Jagadeeswaran et al dedicaram um amplo espaço para o peixe zebra, no seu artigo de revisão *Animal models of thrombosis from zebrafish to nonhuman primates: use in the elucidation of new pathologic pathways and the development of antithrombotic drugs*. O peixe zebra, geneticamente modificado, está a ser proposto como modelo no estudo de uma terapêutica em pessoas com deficiência nas proteínas envolvidas na coagulação como a ATIII. A tabela 4, também adaptada de Jagadeeswaran et al, 2016, resume os genes modificados do peixe zebra para estudos trombóticos.

Tabela 4. Modelos de peixe zebra geneticamente modificados utilizados em ensaios trombóticos (adaptada de Jagadeeswaran et al, 2016).






Método Genético	Gen Objetivo	Referências
Transgênico	α IIb Prometer-GFP	Lin et al, 2005
Transgênico	Fli1 Prometer-GFP	Lawson & weinstein, 2002
Mutagénesse	Protrombina	Gregory et al, 2002
Morfolino Knockdown	f7, f7i, protrombina, FvW, α IIb G6H, mick ta, bambi, irrc32, dcblb2, esam, PKC α , PKCB, hepsin	Carrillo et al, 2010; Gregory et al, 2002; Hughes et al, 2012; Day et al, 2009; Khardekar & Jagadeeswaran, 2013; Gour-oj et al, 2010; Williams et al 2011; O'Connor et al, 2009.
Zinc finger Nuclease Knock out	ATIII	Liu et al 2014

A tabela 5 apresenta um resumo da evolução histórica de modelos inovadores para o estudo das doenças trombóticas, com a finalidade de facilitar uma visão geral de perspectiva da evolução nos diversos métodos de análise trombóticos.

Tabela 5. Esquema cronológico da evolução de modelos de análise da formação trombótica.

Modelo/Aportação/Ano	Realizado em *	Formação do trombo por	Instrumentos
Jagadeeswaran / Peixe zebra / 2016 gene modificado		CaCl ₂ + Veneno víbora	
Adelmann / Thromboemblastometria / 2014		CaCl ₂	
Jayakumar / Radiação Microvasos / 2013		Radiação	
Denis / Ratos Modificados / 1998		FeCl ₃ + Radicais Livres	
Kurz & Main/ Cloreto de ferro / 1990		FeCl ₃	
DiMinno & Silver / Colagenio + Epinefrina / 1983 A.A.S + Etanol		Colagénio + Epinefrina	
Folts / Uso do A.A.S / 1976		Interrupção mecânica	
Born / Coagulação com ADP / 1962		ADP	
Wessler / Estudo da coagulação / 1952		Interrupção mecânica	

*Os desenhos correspondem com o animal ou humano utilizado no modelo.
(Peixe zebra, humanos, ratos, ratos geneticamente modificados, cães e suínos)

-  Ensaio com medições temporais.  Resultados observados por histologia;
-  Com aplicação de temperatura;  Com medição de fluorescência;
-  Medições com espectralfotômetro;  Aplicação de radiação;
-  Tromboemblastometria.

2.2. Modelos utilizados em fármacos antitrombóticos atualmente aprovados para uso em humanos

Tendo em conta os principais fármacos aprovados desde o ano 1997 (Jagadeeswaran et al, 2016), organizaram-se duas tabelas, consoante serem fármacos antiplaquetários ou anticoagulantes (Tabelas 6 e 7 respetivamente), com indicação do animal, o tipo de vaso, a

aplicação ou não de shunt arterio-venoso, ativação sistêmica ou não, modelo associado ou não ao Folts et al (1976).

Tabela 6. Modelos trombóticos utilizados no desenvolvimento de fármacos antiplaquetários aprovados.

Fármacos antiplaquetários aprovados e os modelos de análise trombótico							
Ano de aprovação	Denominação princípio ativo	Testado para aprovação em	Arterial	Venoso	Shunt Arteriovenoso	Ativação Sistêmica	Tipo Folts
2013	Vorapaxar		○	○	○	○	●
2010	Ticagrelor		●	○	○	○	●
2007	Prasugrel		●	○	●	○	○
1997	Clopidogrel		●	●	○	○	●
1997	Eptifibatide		●	○	●	○	●

Tabela 7. Modelos trombóticos utilizados no desenvolvimento de fármacos anticoagulantes aprovados.

Fármacos anticoagulantes aprovados e os modelos de análise trombótico							
Ano de aprovação	Denominação princípio ativo	Testado para aprovação em	Arterial	Venoso	Shunt Arteriovenoso	Ativação Sistêmica	Tipo Folts
2014	Edoxaban		○	●	●	●	○
2010	Dabigatran		●	○	○	○	○
2011	Rivaroxaban		●	●	●	●	○
2011	Apixaban		●	●	●	○	○
1999	Bivalirudin		●	○	●	●	○

No espectro de fármacos desenvolvido desde o século XX encontram-se vários mecanismos de atuação; na atualidade, as principais classes de agentes terapêuticos antitrombóticos em uso são as seguintes:

- 1) Inibidor da COX-1 - AAS;
- 2) Antagonistas dos recetores da ADP P2Y₁₂ – Ticlopidina (Balsano et al., 1990), Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Cangrelor (Harrington et al., 2009) e Elinogrel (Gurbel et al., 2010);
- 3) Inibidores da Gp IIIb/IIa – Abciximab (Simoons, 2001), Eptifibatide e Tirofiban;
- 4) Antagonistas do recetor da trombina – Vorapaxar e Atopaxar (Kogushi et al., 2011);
- 5) Inibidores diretos da trombina – Bivalirudina e Dabigatran;
- 6) Inibidores diretos do fator Xa – Apixaban, Edoxaban e Rivaroxaban;

7) Inibidores do TXA2 – Picotamida (Afonso et al, 2016), Ridogrel (Carty, Macey, McCartney, & Rampton, 2000) e Ramatroban (Terada et al., 1998).

Embora os fármacos aprovados para a terapêutica das doenças trombóticas tenham passado nos testes de eficácia, o objetivo de encontrar um equilíbrio ideal entre a profilaxia antitrombótica e o risco controlado de efeitos indesejáveis ainda não foi atingido. Assim, hemorragias, descompensações ou controle e reversão da ação destes, perante uma possível intervenção cirúrgica, são o alvo de estudo para os métodos de desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas antitrombóticas, como mostram os exemplos de modelos de estudo em substâncias em fase de desenvolvimento (Tópico 2.3).

2.3. Substâncias em desenvolvimento para aprovação do uso farmacêutico em humanos.

Neste tópico apresentam-se 5 compostos/classes com estudos efetuados desde 2012, nomeadamente o óleo de argão, o ACT-246475, derivados de heparina, sulforafano e *limiglidole*, e os métodos que foram utilizados para testar a sua eficácia antitrombótica. Por um lado, encontram-se inovações com tecnologias muito atualizadas mas também é patente a profunda influência das metodologias clássicas já revisadas nesta compilação.

2.3.1. O óleo de argão, efeito antitrombótico *in vitro* e *in vivo*, estudo em ratos. (Mekhfi et al., 2012b)

O estudo de (Mekhfi et al., 2012b) induziu o tromboembolismo pulmonar agudo por meio de uma injeção intravenosa com uma mistura de colagénio e epinefrina. Os resultados mostraram que o óleo de argão inibiu a agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* sem prolongar o tempo de sangramento.

Os animais escolhidos neste ensaio eram camundongos (20-30 g), foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (8-10/Grupo). Os camundongos foram tratados por via oral por 1 semana com água destilada (1 mL/100 g/dia, o grupo controlo), óleo de argão (1 mL/100 g/dia, o grupo tratado), ou (AAS; 100 mg/kg/dia, o controlo positivo).

A dose de óleo de argão foi determinada por estudos prévios. A aspirina, como referência

farmacêutica antitrombótica, foi preparado em água destilada.

Uma hora após o último tratamento, um Tromboembolismo Pulmonar Agudo (TPA) foi induzido na veia da cauda por uma injeção de uma solução trombogénica, composta de colagénio (80 mg/kg) com epinefrina (1 mg/kg), que foi anteriormente estimada para produzir aproximadamente 80% da indução de tromboembolismo.

Imediatamente após a injeção, foi observado o comportamento dos animais, durante um intervalo de 15 minutos, e foi anotado o total de animais que ficou paralisado e animais mortos em cada grupo. A percentagem de proteção contra o TPA, determinada pelo efeito antitrombótico do óleo de argão e AAS, foi calculada e apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Efeito do óleo de argão no tromboembolismo pulmonar agudo em camundongos (adaptada de Mekhfi et al., 2012a).

Tratamento	Dose	Paralisia ou morte animal/ Total	Proteção (%)
Água destilada (controlo)	1ml/100 g/dia	8/10	20
Óleo de Argão	1ml/100 g/dia	4/8*	50
AAS	100 mg/kg/dia	6/10*	40

As amostras foram administradas por via oral previamente à injeção na cauda, com colagénio (80 mg/kg) e epinefrina (1 mg/kg). O teste Qui-quadrado foi usado para examinar a diferença entre o grupo de controlo e o grupo tratado.

*Não significativo em relação ao controlo.

O estudo histológico foi realizado no tecido pulmonar para estimar a percentagem de vasos obstruídos por trombos plaquetários.

O teste de coagulação foi monitorizado em plasma pobre em plaquetas de ratos normais medindo os parâmetros de coagulação (tempo de tromboplastina parcial ativado, tempo de protrombina e tempo de trombina) na presença e ausência de óleo de argão. Para isso utilizou-se um sistema automático (coagulometer Thrombostat Behnk Elektronik), um kit de reagentes do fabricante, e o método de Lau (Lau et al., 2009). Em todos os testes de coagulação, o óleo de argão foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 0,5%. Brevemente, o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi pré incubado com óleo de argão (0,5; 1 e 2 mg/mL) por 5 minutos a 37°C. A seguir o plasma (50 µL) foi misturado com 50 mL de cephalin. O processo de coagulação para o plasma

incubado (50 mL) foi iniciado pela adição de CaCl_2 25 mM (50 mL), de tromboplastina (100 mL), e de trombina bovina (100 mL), para as determinações de Tempo de Protrombina Parcial Ativada (TTPA), Tempo de Protrombina (TP), e de Tempo de Trombina (TT), respetivamente.

A atividade do óleo de argão foi avaliada comparando a coagulação do plasma sem tratamento (controlo de plasma com DMSO 0,5%) e tratadas com heparina (0,23 e 0,46 U/mL) por 5 minutos a 37°C (controlo positivo).

As conclusões do estudo afirmam que o óleo de argão (1 mL/100 g/dia), administrado por via oral, mostrou uma atividade antitrombótica prevenindo a paralisia ou morte (50%) induzida pela injeção intravenosa colagénio-epinefrina. Esta observação foi confirmada pelo exame histológico do pulmão, em que a densidade dos vasos sanguíneos ocluídos diminuiu significativamente ($P=0,004$) ($62,16 \pm 3,95\%$). No entanto, o óleo de argão permaneceu inativo para os parâmetros de coagulação do TTPA, TP e TT, em desacordo com a heparina, um medicamento de referência anticoagulante. A atividade antitrombótica do óleo de argão parece não estar relacionada à atividade anticoagulante (Hassane et al., 2012).

2.3.2. ACT-246475 antagonista reversível do P2Y₁₂, ensaios comparativos com o ticagrelor (Rey et al., 2017).

2.3.2.1. Método comparativo frente ao ticagrelor da eficácia e risco antitrombótico em ratos.

A finalidade deste estudo foi comparar dois fármacos de ação direta, o ACT-246475, antagonista reversível P2Y₁₂, e o ticagrelor (Figura 5), em um modelo de análise de trombose em ratos por quantificação simultânea de sua eficácia antitrombótica, induzida pela cirurgia e perda de sangue. O fluxo de sangue foi avaliado na artéria carótida após aplicação de FeCl₃ para induzir a formação do trombo, utilizando uma sonda de fluxo Doppler. Ao mesmo tempo, a perda de sangue depois da ferida cirúrgica foi quantificada no baço.

Uma administração contínua da ACT-246475 e ticagrelor foi usada para reduzir os danos provocados pela lesão do fluxo sanguíneo. Os resultados histológicos indicaram que, pela aplicação de altas doses de ambos os compostos, o fluxo sanguíneo foi normalizado e o trombo foi completamente eliminado.

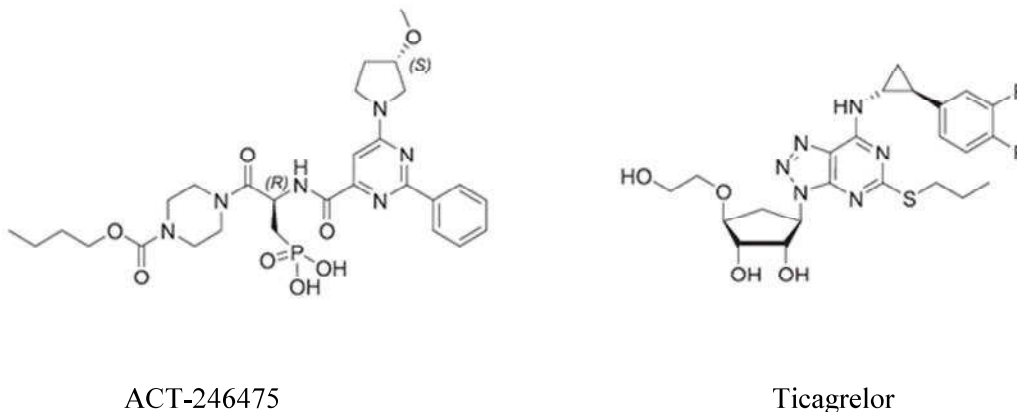


Figura 5. Estrutura química do ACT-246475 e do ticagrelor (adaptada de Rey et al., 2017).

Este estudo foi realizado em ratos de acordo com as leis de proteção animal da Suíça, com ratos Wistar machos que foram adquiridos nos laboratórios de Harlan B.V., Venray (NL). Todos os animais estiveram armazenados em conformidade com as diretrizes locais veterinárias (Basel Landschaft).

Origem dos reagentes deste estudo: ACT-246475 foi sintetizada no Departamento de Química Medicinal em Idorsia Pharmaceuticals Ltd Stansstad, Suíça; Ticagrelor foi sintetizado de acordo com os protocolos publicados; acetilcolina, fenilefrina, e U46619 foram adquiridos da Sigma (EUA).

2.3.2.2. Estudo *in vivo* da trombose provocada por FeCl₃, eficácia do ACT-246475 frente a o Ticagrelor.

O modelo de estudo em ratos para trombose e perda de sangue, foi realizada com base em relatórios anteriores (Kurz et al. 1990). Especificamente, os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 150 mg/kg sal de sódio hidratado (thiobutabarbital Inactin®). A temperatura foi mantida a 36-38°C, com um aquecimento controlado termostaticamente.

Após a traqueotomia, um cateter foi inserido na veia femoral direita para infusão e testar compostos durante 50 minutos usando uma bomba (Precidor Infors AG, Bottmingen), à taxa de 0,05 mL/kg/minuto. Um segundo cateter foi inserido na artéria femoral direita para coletar amostras de sangue.

A artéria carótida direita foi dissecada cuidadosamente, livre de tecido conjuntivo, e um tubo de fluxo de Silastic (D-20-0,8 mm; Triton Technologies Inc., EUA) foi colocado na artéria para medição da velocidade do fluxo sanguíneo. Após 20 minutos de infusão de veículo, ACT-246475, ou ticagrelor, papel filtro foi embebido com FeCl₃ 200 mg/mL (20%) (FeCl₃, Fluka N°44943, Suíça) e colocado sobre a artéria carótida anterior para o fluxo por 5 minutos para causar a lesão arterial, e a velocidade do fluxo sanguíneo carotídeo foi medido por 30 minutos após a deposição de FeCl₃, o baço foi puncionado com um punção para biópsia de 4 mm (Stiefel, Alemanha) e sangue foi coletado por 30 minutos; a quantidade de perda de sangue foi calculada em gramas. Todos os experimentos foram cegos para o tratamento. No final do experimento, os ratos foram sacrificados por uma infusão intravenosa de pentobarbital (100 mg/kg; Esconarkon, Streuli Pharma AG, Suíça).

As velocidades de fluxo sanguíneo carotídeo foram registadas num sistema utilizando PowerLab (IOX software de dados, Tecnologias Emka, França) e analisados utilizando Datanalyst (versão 2.10.17; Emka tecnologias). O fluxo sanguíneo basal foi calculado para cada rato usando a média do fluxo sanguíneo durante 100-110 batimentos consecutivos no final da deposição de FeCl₃. A área entre as curvas (ABC) foi calculada utilizando-se fluxo sanguíneo delta (mudança de fluxo basal em %) versus tempo (30 minutos). Cálculo do ABC é um sistema integrado de método analítico para quantificar as respostas ao longo de todo o período de avaliação.

Para garantir uma comparação objetiva, imparcial dos dois antagonistas dos recetores P2Y₁₂, foram estabelecidos protocolos de administração contínua, resultando no plasma exposições ao composto de uma tradução de baixa (30-50%), intermediário (55-75%) ou alto (80-100%), inibição da agregação plaquetária. Na presença de veículo, deposição de FeCl₃ induziu uma diminuição rápida da velocidade do fluxo sanguíneo. Os resultados do ACT-246475 e do ticagrelor como inibidor do FeCl₃ como indutor da formação de trombos em artéria carótida dos ratos foram apresentados na figura 6.

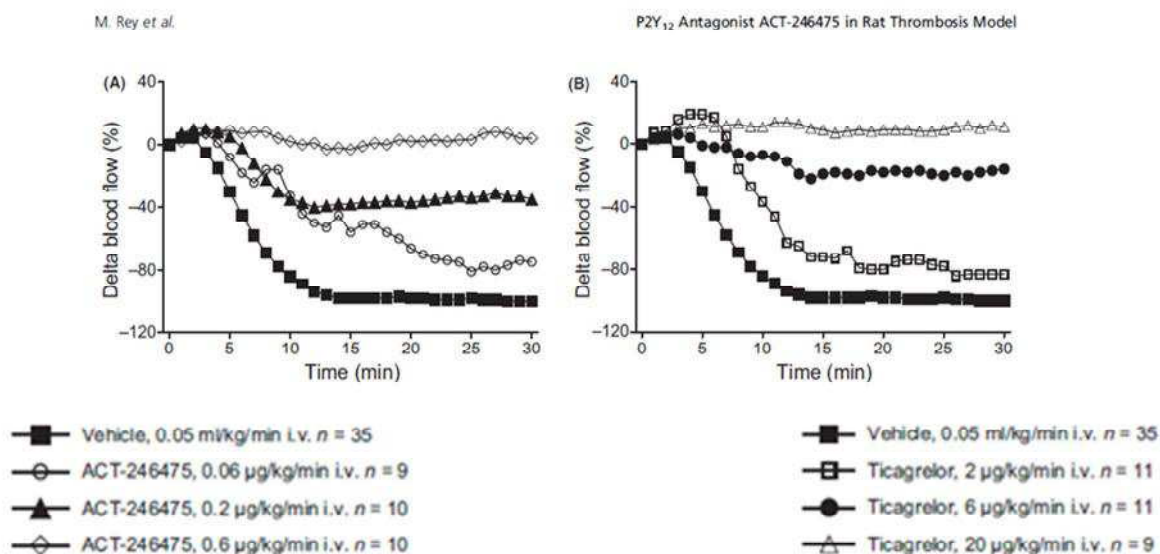


Figura 6. Fluxo sanguíneo após FeCl₃ arterial induzida pela lesão. O máximo de diminuição do fluxo de sangue na presença de veículo foi definida como 100% de redução da velocidade do fluxo sanguíneo. Efeitos do ACT-246475 (Gráfico A) e ticagrelor (Gráfico B) são expressos em % mudança na velocidade do fluxo sanguíneo carotídeo em relação ao fluxo basal. ACT-246475 e ticagrelor foram dissolvidas em PEG 400 (7,5% v/v), PG (7,5% v/v), o Cremofor (5% v/v), em tampão fosfato pH = 7,4 a uma concentração de 1 mg/mL. Veículo: PEG 400 (7,5%), PG (7,5%), o Cremofor (5%) tampão fosfato, pH = 7,4. Os dados estão apresentados como médias, n = 9-35 (retirada de Rey et al, 2017).

A tabela 9 sumariza os efeitos antitrombóticos observados, tendo em conta adições progressivas dos dois compostos, designadamente 0,0; 0,06; 0,2 e 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de ACT246475 e 0,0; 2,0; 6,0 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de ticagrelor.

Tabela 9. Efeitos antitrombóticos dos antagonistas P2Y₁₂ no modelo FeCl₃ em ratos. (retirada de Rey et al, 2017).

ACT-246475 infusion ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	0	0.06	0.2	0.6
Mean area of vascular lumen occluded by thrombi (n = 4)	100%	52%	29%	20%
Blood flow (means \pm SEM)	0%	25 \pm 9%	65 \pm 16%	104 \pm 2%
n = number of rats	n = 35	n = 9	n = 10	n = 10
Patency of carotid artery				
Open	0/35	0/9	6/10	10/10
Partially occluded	0/35	4/9	1/10	0/10
Occluded	35/35	5/9	3/10	0/10
Ticagrelor infusion ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	0	2	6	20
Mean area of vascular lumen occluded by thrombi (n = 4)	100%	94%	37%	19%
Blood flow (mean \pm SEM)	0%	17 \pm 5%	84 \pm 12%	111 \pm 4%
n = number of rats	n = 35	n = 11	n = 11	n = 9
Patency of carotid artery				
Open	0/35	0/11	6/11	9/9
Partially occluded	0/35	2/11	4/11	0/9
Occluded	35/35	9/11	1/11	0/9

Quantificação plaquetária trombo. Uma secção da artéria carótida em parafina, foram desparafinizadas e reidratadas e corados com hema- toxylin e eosina para exame histopatológico e avaliação morfométrica de trombos ricos em plaquetas. A percentagem média de área do lúmen vascular ocluído foi calculado a partir de uma secção por rato (n = 4). A quantificação do fluxo sanguíneo em 30 minutos. O fluxo arterial médio no final de administração (ou seja, 30 minutos) foi quantificada e expressa como uma percentagem do fluxo sanguíneo basal medido em cada vaso do rato antes da lesão. Avaliação da obstrução do vaso. Ao término da infusão, a obstrução da artéria carótida foi determinada aberta (sem comprometimento do fluxo sanguíneo), parcialmente ocluída (menos de fluxo sanguíneo basal) ou oclusão do fluxo sanguíneo (nenhum)

2.3.2.3. ACT-246475 e ticagrelor, método de estudo comparativo da vasoreatividade na artéria femoral com ratos.

O estudo foi avaliado após a eutanásia, os anéis de artéria femoral foram preparados usando uma técnica padrão (Duckles et al. 1985). Resumidamente, as artérias femorais direita e esquerda foram isoladas. Dois anéis arteriais (1,5 mm) foram preparadas a partir de cada artéria e vasos suspensos entre 40 µm de aço em um sistema myograph Mulvany - Halpern (10 mL) contendo tampão KrebsHenseleit modificado com a seguinte composição (mmol/L): NaCl 115; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,5; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; Glicose 10, para evitar danos ao endotélio. As soluções foram mantidas a 37°C e aeradas com 95% O₂/5% CO₂/(pH 7,4). Depois do repouso aplicou-se uma força de 3,92 mN.

A seguir às aplicações registaram-se as alterações com um gravador de força isométrica (Fio Myograph Multi Modelo 610 Versão 2.2 M; DMT A/S, Dinamarca) ligado num sistema de dados (EMKA EMKA Technologies Inc, França). A viabilidade da artéria femoral foi testada medindo a contração ao KCl (60 mmol/L), na presença de endotélio funcional, e a relaxação pela acetilcolina (10⁻⁵ mmol/L). Os testes de medições da contração da artéria femoral realizaram-se com Estimulação de Campo Elétrico (ECE) e os anéis de artéria foram colocados entre os elétrodos de platina e estimulados cada 5 minutos (17V, 0,5 msec de pulso, 10 segundos, 4-24 Hz) usando um estimulador elétrico (EMKA Technologies Inc).

Em cada vaso obtiveram-se duas curvas de frequência de contração: uma primeira resposta de controlo seguido, de um período de recuperação, por uma segunda curva na presença do composto de ensaio (20 minutos). A contração do composto de ensaio foi expressa como uma percentagem da máxima no primeiro controlo de resposta.

Os efeitos dos antagonistas dos recetores P2Y₁₂ em três mecanismos gerais para a regulação

do tônus vascular *ex vivo*, foram estudados em artérias femorais de ratos: (1) o relaxamento da musculatura vascular lisa; (2) a vasoconstrição endógena com adição de noradrenalina ECE e (3) a vasoconstrição exógena com adição de fenilefrina.

O relaxamento da musculatura lisa vascular foi investigada utilizando anéis isolados da artéria femoral de ratos. As argolas foram pré-contraídas e o potencial efeito vasodilatador dos dois antagonistas foi medida (Figura 7). ACT-246475 não provocou um efeito de relaxamento nos anéis arteriais da femoral. O ticagrelor causou um relaxamento dependente da concentração na argola pré-contraída na artéria femoral com EC_{50} de $3,9 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$ e E_{max} de $84,2 \pm 12,9\%$.

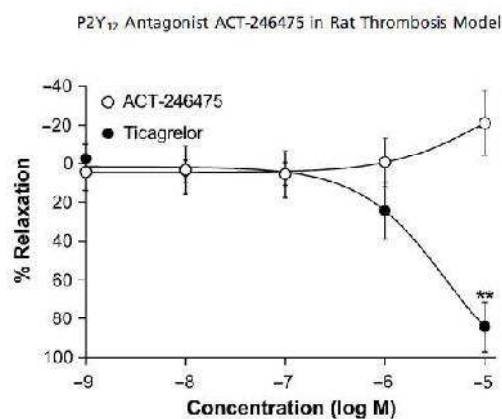


Figura 7. Relaxamento da artéria femoral pré-contraída. Relaxamento da artéria femoral isolada do rato para ACT-246475 (círculos brancos) e ticagrelor (círculos pretos). Anéis de artéria femoral foram pré-contraídos com $1 \mu\text{mol/L}$ U46619, e incrementadas as concentrações dos dois antagonistas dos receptores P2Y₁₂ foram adicionados no órgão. Os dados estão apresentados como médias \pm SEM, $n = 4-6$. $**P < 0,01$ (adaptada de Rey et al, 2017).

Os resultados da contração da artéria femoral de ratos por aplicação de campo elétrico de estimulação estão apresentados na figura 8. ECE causa uma frequência-dependente (4-24 Hz) na contração da artéria femoral, que foi cortada pela tetrodotoxina (10^{-7} mol/L) e prazosin (10^{-7} mol/L), confirmando que a vasoconstrição induzida por ECE é de origem neuronal mediada pela ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos. ACT- 246475 com 10^{-5} mol/L não inibem a contração da artéria femoral pelo ECE (Figura 8A). Em contraste, ticagrelor com 3×10^{-6} e 10^{-5} mol/l inibiram significativamente a contra da artéria femoral de ratos ao ECE em todas as frequências testadas (Figura 8B).

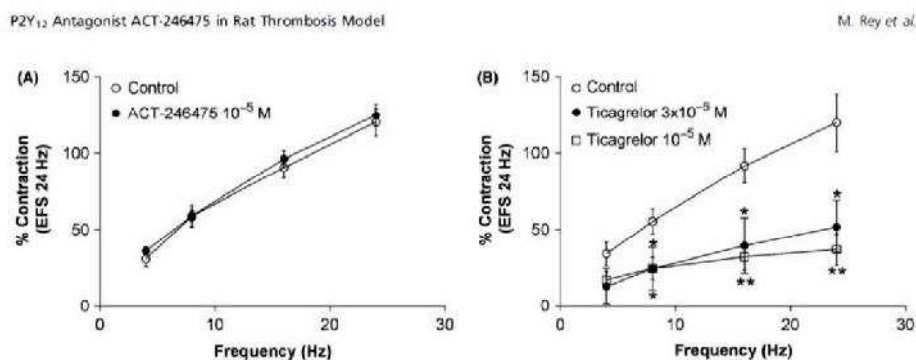


Figura 8. Prevenção da contração da artéria femoral de ratos por aplicação de campo elétrico de estimulação. Efeitos do ACT-246475 ticagrelor (A) e (B) na contração da artéria femoral de ratos por Estimulação de Campo Elétrico. Contração observada no primeiro controle de resposta 24 Hz foi definido como 100%. Controle: círculos aberto, estudo de drogas: círculos pretos e quadrados abertos. Os dados estão apresentados como médias SEM, n = 4-6. * $P < 0,05$; $P < 0,01$ ** (adaptada de Rey et al, 2017).

Além disso, o ACT-246475 em 10⁻⁵ mol/L não inibiu a contração à fenilefrina (Figura 9A), considerando que o ticagrelor inibiu a contração da artéria femoral em uma concentração dependente. Em 10⁻⁵ mol/L, o ticagrelor anula a contração quase completamente da fenilefrina (Figura 9B).

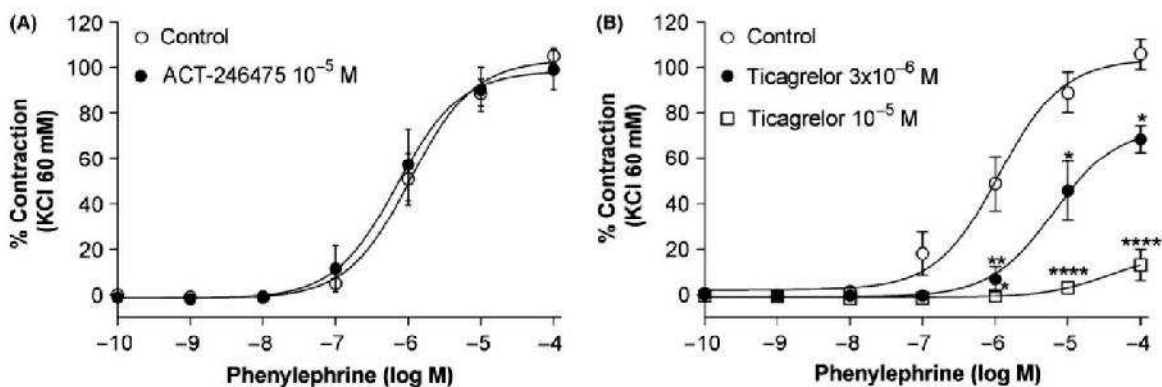


Figura 9. Prevenção da contração da artéria femoral à fenilefrina. Efeitos do ACT-246475 (A) e ticagrelor (B). Controle: círculos abertos, drogas: círculos pretos e quadrados brncos. Os dados estão apresentados como médias \pm SEM, n = 4. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; $P < 0,0001$ **** prasugrel (Retirada de Rey et al, 2017).

2.3.2.4. Monitorização da agregação plaquetária em ratos tratadostratados com ACT-246475 frente a ticagrelor.

Os ratos Wistar foram anestesiados por via intraperitoneal por injeção de tiobutabarbital

hidróxido de sódio 150 mg/kg (Inactin®; Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Suíça). Após fazer uma traqueotomia com uma cânula venosa (9 Introcan, 20G 1¼, B Braun, REF 4252110 B, Sempach, Switzer- land) foi inserida na artéria carótida direita e 7-10 mL de sangue foi recolhido numa seringa contendo napsagatran 1 mL (1 mmol/L em 0,9% NaCl, 1% de DMSO), um inibidor da trombina (Ro 46-6240 de Hoffmann - La Roche, Suíça). O sangue foi centrifugado por 5 minutos a 650 g e o PRP foi armazenado a 37°C e, posteriormente, a agregação plaquetária foi avaliada por um Agregómetro de Transmissão de Luz (ATL) (Labordiagnostica Sonda & Go GmbH, Alemanha), com o software AggroLink.

A agregação foi iniciada pela adição de 10 µl de solução ADP em 240 µL de PRP a (520x10⁶ plaquetas/mL) foi iniciada e monitorada até 8 minutos. Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando -XLfit software (IDBS, Reino Unido).

Na avaliação da capacidade do ACT-246475 e do ticagrelor para inibir a ADP como indutora da agregação de plaquetas nos ratos, utilizaram-se doses crescentes. O ACT-246475 inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP 1 µmol/L, com um IC₅₀ de 55 ng/mL (106 nmol/L) enquanto o ticagrelor com um IC₅₀ de 165 ng/mL (316 nmol/L).

O artigo concluiu que o ACT-246475 ofereceu resultados sensivelmente mais aceitáveis relativamente à eficácia do ticagrelor, tendo em conta as evidências.

No geral, os resultados do estudo comprovaram a utilidade do modelo rato para determinar a eficácia de fármacos antitrombóticos dose-dependente.

2.3.3. Derivados de heparina. Modelo de análise para a comparação da atividade anticoagulante, antitrombótica e hemorrágica em fármacos alternativos às heparinas em ratos (Miranda, Nader, Bouças, & Bouças, 2012).

Analisou-se neste estudo, o potencial do uso de novas drogas anticoagulantes como agentes terapêuticos em doenças trombóticas comparando os resultados de heparinas, Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM) e penta-sacarídeos de heparina, e alguns compostos semelhantes à heparina, como oligossacarídeo C3, PI-88 (fosfossulfomanana), fucanas sulfatadas de *Spatoglossum schröderi* e defibrotides (polidesoxirribonucleotídeos de fita simples) exibem atividade antitrombótica em diferentes modelos animais (Nader et al.,

2001).

A atividade anticoagulante foi determinada seguindo-se os critérios da United States Pharmacopeia (USP). Amostras com diferentes concentrações foram adicionadas a tubos de ensaio e secas a vácuo. As amostras foram então resuspensas em 160 ml de solução salina e foram adicionados 200 ml de plasma de carneiro citratado, e a mistura equilibrada a 37°C. A seguir, foram adicionados 40L de uma solução de cloreto de cálcio a 1%, e o conteúdo foi misturado. A mistura foi então mantida a 37°C por 60 minutos. Após esse período, foi observada a formação ou não da rede de fibrina. A atividade anticoagulante de cada amostra foi dada em relação à da heparina padrão ensaiada nas mesmas condições, cuja atividade é conhecida como 166 Unidade Internacional (UI). Uma UI é definida como a quantidade de heparina que mantém 1mL de plasma de carneiro fluido por 1 hora, quando adicionada em 0,8mL de salina, após a adição de 0,2 mL de CaCl₂ 1%.

A tabela 10 mostra a origem dos compostos (droga) em estudo, os alvos objetivos e as suas indicações terapêuticas.

Tabela 10. Principais características de compostos similares à heparina e fármacos antitrombóticos (retirada de Miranda et al, 2012).

DROGA	ORIGEM	ALVO	INDICAÇÃO
HEPARINA	Pulmão bovino	Antitrombina Cofator II da heparina	Prevenção de Trombose Venosa Profunda
CLEXANE (Heparina de baixo peso molecular)	Esterificação por β -eliminação da heparina	Antitrombina	Prevenção de Trombose Venosa Profunda
C3 (Oligossacarídeo derivado da heparina)	Irradiação Gama da heparina	Fator Xa Antitrombina	Tratamento de doenças neurológicas como doença de Alzheimer. Possui efeito anti-inflamatório e baixa ação anticoagulante
PI-88 (fosfossulfomanana)	Exopolissacarídeo extraído de levedura <i>Pichia holstii</i>	Cofator II da heparina	Potente agente antiangiogênico e anti-metastático. Possui efeitos anticoagulantes e antitrombóticos.
PI-88 (fosfossulfomanana)	Exopolissacarídeo extraído de levedura <i>Pichia holstii</i>	Cofator II da heparina	Potente agente antiangiogênico e anti-metastático. Possui efeitos anticoagulantes e antitrombóticos.
PENTASSACARÍDEO sintético da heparina	Agente sintético produzido a partir da heparina	Fator Xa Antitrombina	Profilaxia de Tromboembolismo venoso
DEFIBROTIDE (desoxirribonucleotídeo de rita simples/desoxirribonucleotídeo de rita simples)	Derivado de mucosa intestinal suína	Ativador de Plasminogênio Tecidual Trombina	Prevenção de Trombose Venosa Profunda (TVP) após cirurgia. Possui ainda propriedades antitrombóticas, trombolíticas e anti-iscêmicas.
FUCANAS	Alga marrom <i>Spatoglossum schroederi</i>	Cofator II da heparina	Atividade antitrombótica pós 24 horas

Os resultados de atividade anticoagulante e de atividade antitrombótica *in vivo* para as amostras testadas segundo Reyers et al. (1980), apresentam-se na tabela 11.

Tabela 11. Características farmacológicas dos compostos semelhantes à heparina e outras drogas antitrombóticas (retirada de Miranda et al, 2012).

Amostras	Atividade Anticoagulante (USP) (IU/mg)	Atividade Anti-trombótica "in vivo" (U/mg)	Atividade Hemorrágica "in vivo"	Média das Massas Moleculares (kDa)
Heparina	166	96	+	12,0
Clexane	66	119	+	4,50
C3	26	100	+	2,26
PI-88	60	66	+	2,0
Pentassacarídeo	62	30	+	1,75
Fucana	<5	<5	-	21,0
Defibrotide	<5	42	-	10,0

USP: United States Pharmacopeia - Ensaio Anticoagulante; (+): positivo; (-): negativo.

Para a determinação da actividade antitrombótica, a cavidade abdominal foi aberta e expôs-se a veia cava inferior. Na veia caudal foi aplicada a droga que se desejava estudar. Após 5 minutos, foi feita uma ligadura na veia cava inferior, distalmente ao ponto da origem. A cavidade abdominal do animal foi então fechada com pontos simples. Após 1 hora, a cavidade foi reaberta e nova ligadura foi feita 1cm abaixo da primeira. O segmento venoso entre as duas ligaduras foi removido e colocado em uma placa de Petri. O eventual trombo formado foi, então, retirada, lavado em solução salina e colocado em papel de filtro previamente seco e pesado. O papel de filtro contendo o trombo foi novamente seco a vácuo por 12 horas e pesado. A diferença de peso do papel antes e depois de conter o trombo permitiu determinar o peso do trombo formado. Os modelos antitrombóticos foram planejados para simular as situações de emprego de compostos na profilaxia do Tromboembolismo Pulmonar (TP) e para o seu uso no tratamento de trombose venosa profunda.

A medição do risco e da atividade hemorrágica foi calculada, utilizando-se o modelo de Cruz e Dietric (1967), com algumas alterações. Realizou-se uma tricotomia da parte final da cauda do rato, seguida de uma escarificação na porção distal da cauda. Em seguida, a cauda foi introduzida num tubo de ensaio, imersa numa solução de 3mL contendo 2mL da solução salina tamponada (NaCl 0,85%, NaHCO₃ 0,1mM, pH 7,0 37°C). A sequência do

experimento consistiu em mergulhar, verticalmente, a cauda escarificada em salina e acompanhar o processo de sangramento. Depois, e por meio de um estímulo mecânico obteve-se novo sangramento, a cauda foi mergulhada numa solução salina renovada. A proteína liberada da lesão, nesse processo, serviu como controle para os ensaios posteriores. Foram realizadas 3 reaberturas da lesão, com intervalos de 10 minutos, tomando-se uma média referente a um controle de sangramento. Depois dos 3 estímulos mecânicos, a cauda foi mergulhada numa solução contendo o fármaco a ser analisado. Após determinados períodos de tempo, a cauda foi removida da solução e lavada intensamente com solução salina, e o efeito hemorrágico residual observado. Os resultados foram expressos pela razão entre a soma cumulativa da taxa de proteínas liberadas da lesão antes e após o contato com o fármaco em estudo. A figura 10 apresenta graficamente os resultados de atividade antitrombótica, atividade anticoagulante e atividade hemorrágica para os sete compostos testados.

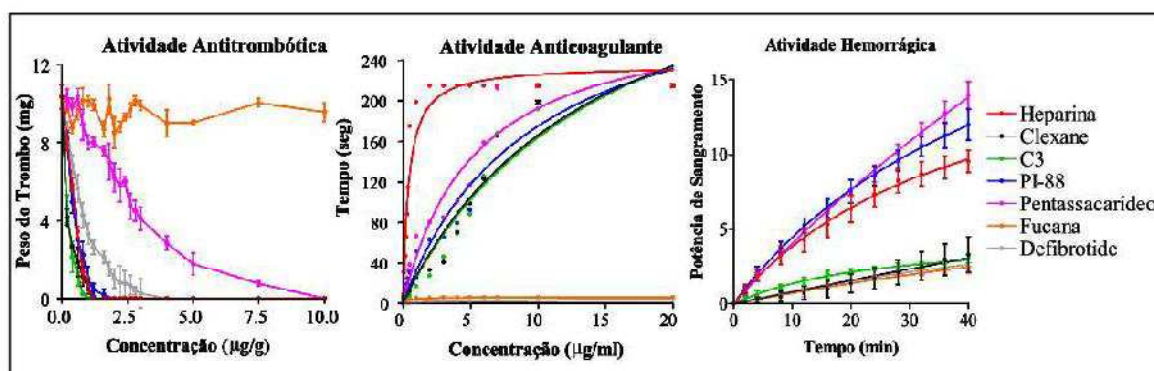


Figura 10. Características farmacológicas dos compostos semelhantes à heparina e outras drogas antitrombóticas (retirada de Miranda et al., 2012).

A comparação entre os compostos revelou que Clexane e C3 apresentaram alta atividade AT, mais eficiente do que a heparina. Por outro lado, esses mesmos compostos apresentaram baixo efeito hemorrágico e anticoagulante, quando comparados com a heparina não fracionada. Já PI-88 e pentassacarídeo sintético de heparina apresentaram alta atividade hemorrágica e anticoagulante, diferentemente de suas atividades antitrombóticas. Em relação às fucanas e aos defibrotides, nenhum desses compostos apresentou atividade anticoagulante ou hemorrágica. De ressaltar ainda que o defibrotide apresentou uma pequena atividade antitrombótica e a fucana só foi capaz de apresentar atividade antitrombótica após 24 horas de exposição (dados não mostrados).

2.3.4. Sulforafano. Método de análise *in vivo* por ADP- trombose pulmonar aguda induzida em ratos (Jayakumar et al., 2013)

Utilizando um método turbidimétrico, foi medida a agregação plaquetária com um Lumi-agregômetro (Payton, Scarborough, Canadá), seguindo as guias para trabalhos nos laboratórios animais (NIH Publicação No. 85-23. 1996). Várias doses de sulforafano (0,125 e 0,5 mg/kg) e solução veículo (0,5% DMSO, total 50 μ L) foram administrados por injeção na veia caudal de ratos (ICR estirpe, 20-24 g) durante 14 minutos, seguindo-se uma injeção de ADP (700 mg/kg) na veia contralateral.

Os ratos foram anestesiados com hidrato cloral (40 mg/kg, i.p.), e a veia jugular externa foi canulada com PE-10 para administração do corante e do fármaco (por um bolus endovenoso). Vênulas (30-40 μ m) foram selecionados para a irradiação (abaixo de 520 nm) para produzir um microtrombo. Várias doses de sulforafano (0,125 e 0,25 mg/kg) foram administradas e 1 minuto depois aplicou-se fluoresceína de sódio (15 μ g/kg). De seguida, o lapso de tempo foi medido para induzir a formação de trombos, que levam a cessação do fluxo de sangue. A taxa de mortalidade dos ratos de cada grupo foi determinada dentro de 5 minutos após a injeção. Os detalhes deste procedimento e os resultados apresentam-se nas figuras 11 e 12 seguintes.

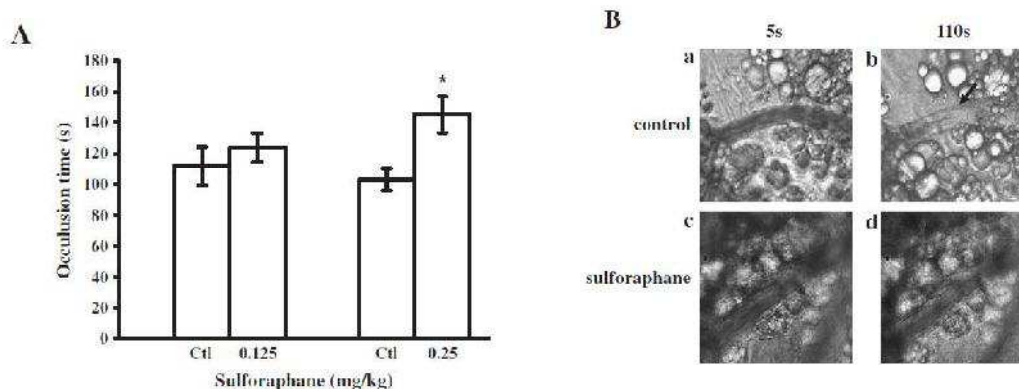


Figura 11. A influência de sulforafano no prolongamento do tempo de oclusão para induzir a formação de trombo em vênulas mesentérico de ratos. (A e B) foram administrados 0,5% DMSO (CTL) ou sulforafano (0,125 e 0,25 mg/kg) após o qual vênulas mesentéricas foram selecionadas para irradiação para induzir a formação de microtrombos. Os dados do gráfico de barras em (A) correspondem à média e desvio padrão do tempo de oclusão (em segundos, s) para induzir a formação de tampão plaquetário (n=5). * $P < 0,05$ em comparação com o grupo de controlo. As imagens microscópicas em (B) foram tomadas de amostras tratadas com solução controlo (a, b) e solução de sulforafano (0,25 mg/kg) (c, d). Os tempos das imagens correspondem a 5 s (a, c) e 110 s (b, d) após a irradiação. As fotografias são exemplos representativos de cinco experiências similares (ampliação 400 \times). As setas indicam as formações plaquetárias (adaptada de Jayakumar et al., 2013).

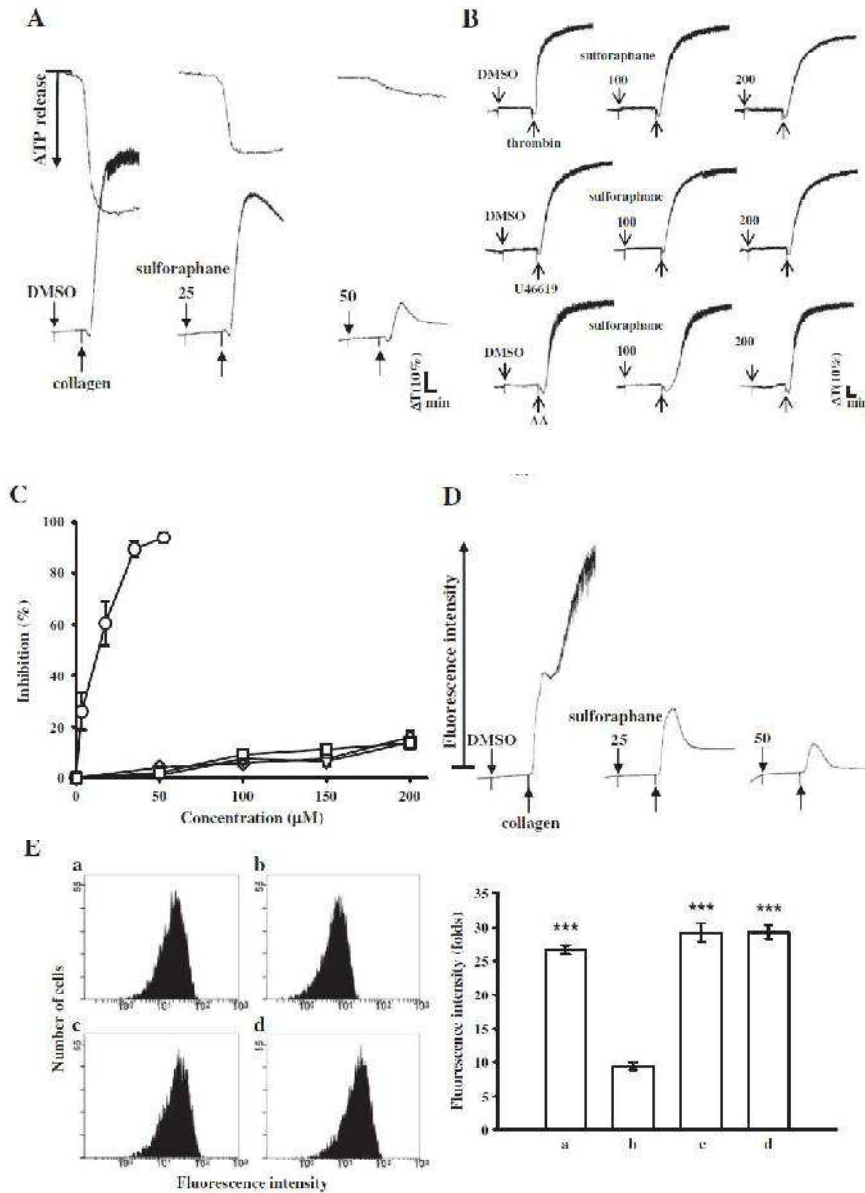


Figura 12. Efeitos do sulforafano na inibição da agregação plaquetária, perante $[Ca^{2+}]$ Mobilização, e FITC-triflavin vinculativo para a integrina $\alpha IIb\beta 3$ em plaquetas ativadas. Lavou as plaquetas ($3,6 \times 10^8$ células/ml), com 15 preincubadas μ Msulforaphane de 200 ou 0,5% de DMSO, seguida pela adição de 1 μ g/ml (○ de colagénio), 1 μ MU46619 (∇), 60 μ Marachidonic ácido ou de 0,05 UI/ml a trombina (□) para disparar (A-C) a agregação plaquetária e a liberação de ATP (A reação, traçados superior) ou (D) mobilização de Ca^{2+} (E) A linha sólida representa a perfis de fluorescência (a) 2 μ g/ml FITC-triflavin na ausência de sulforafano como controle positivo; (b) na presença de 5 mM de EDTA como um controle negativo; ou na presença de 25 (c) e (d) 50 μ Msulforaphane, seguida pela adição de 2 μ g/ml FITC-triflavin. Perfis (A, B, D) são exemplos representativos de quatro experiências similares. Os dados em (E) são apresentados em média e desvio padrão. (n=4); *** $P < 0,01$ em comparação com o grupo de EDTA (b) (adaptada de Jayakumar et al., 2013)

2.3.5. *Limiglidole*. Modelo da atividade em ratos (Kucheryavenko, Spasov, & Smirnov, 2015)

No estudo realizado por Kucheryavenko et al. (2015) foi testado o *limiglidole*, um composto hipoglicémico, no modelo trombótico colagénio-epinefrina. As experiências realizaram-se em ratos camundongos albinos outbred, machos e fêmeas, uma amostra de 40 ratos (n=40) com peso padronizado de 20-25g e mantidos em viveiros a 22-24°C, com humidade relativa de 40-50%, em um regime de dieta padronizado (GOST R 50258-92), e com luz natural. Os testes foram realizados em conformidade com as normas de boas práticas de laboratório para investigação pré-clínica (GOST 1000.4-96 51000.3-96 e Z Rússia) e com as recomendações internacionais da Convenção Europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados em estudos experimentais.

A atividade antitrombótica foi testada utilizando uma mistura de soluções de colagénio (0,5 mg/kg) e epinefrina (0,06 mg/kg). A mistura, em volume total de 0,1 mL, foi injetada em 10 segundos na veia caudal do animal e 2 horas após a administração oral de 36 mg/kg de *limiglidole* ou 20 mg/kg de AAS. Os animais de controlo receberam um volume equivalente do solvente. A eficácia das substâncias foi avaliada pelo número de sobreviventes e a presença de coágulos de sangue nos vasos pulmonares. Os sobreviventes foram observados durante um dia e depois eutanasiados com éter. Os resultados demonstraram que, no grupo de controlo, 95% dos ratos morreram, em concordância com dados publicados; nestes casos, foram observados sinais de comprometimento da função pulmonar respiratória.

Todos os animais foram submetidas à necropsia para avaliação histológica dos pulmões. Os espécimes foram fixados e tamponados a 10% (pH 7,4) durante 24 horas, desidratados, e incorporados em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em seções de 4-6 µm. Os cortes histológicos foram fotografados com uma câmara digital Olympus (4,0 megapixel) ligada ao microscópio. Os sinais de trombose nas paredes das artérias musculares foram avaliados histologicamente. A análise estatística dos efeitos de drogas antitrombóticas (avaliação da diferença entre as proporções de animais que sobreviveram nos 3 grupos) realizou-se pelo teste F de Fisher e a estatística da histologia realizou-se com o Test-Morpho e o Mann-Whitney. Em relação à redução da área média de coágulos de sangue nas seções de pulmões de rato, os resultados indicaram que a atividade do *limiglidole* ultrapassou em duas vezes a do AAS.

3. Considerações finais, situação e perspectiva sobre os modelos de análise antitrombóticos.

Para se chegar a fármacos mais eficazes e mais seguros contra as doenças trombóticas, é preciso continuar a desenvolver os métodos/modelos de avaliação destes fármacos.

A capacidade de provocar trombos de tamanhos controlados, de modo reprodutivo, de interpretar as variedades da sua composição e de visualizar quantitativamente as alterações que os diversos tipos de trombo trazem para o sistema vascular, são desafios que continuam a merecer novos ensaios laboratoriais, com vista a otimizar o modelo trombótico.

Neste estudo de revisão verificou-se que nos ensaios pré-clínicos há uma prevalência dos modelos de estudo *in vivo* com animais vertebrados, tendo-se iniciado com os de grande tamanho, como cães, porcos e coelhos, e posteriormente, uma vez garantida a semelhança com os humanos, a viabilidade económica e a facilidade de manuseamento, os murinos tornaram-se o modelo mais frequente.

Nas metodologias apresentadas nesta revisão, a formação dos trombos é quase sempre conseguida num curto espaço de tempo, para que seja possível a sua análise imediata. No entanto, a realidade é mais abrangente, uma vez que a formação trombótica nos humanos deve-se a uma multiplicidade de fatores como a alimentação, aterosclerose e hábitos de vida, entre outros, que podem contribuir lentamente para o desenvolvimento de um trombo fatal.

Hoje em dia, há uma política crescente segundo a qual se procura seguir o método dos 3 R (*Reduction, Replacement, Refinement*). Desta forma, estimula-se a utilização de métodos alternativos que evitem o sacrifício e possível sofrimento de animais com sistema nervoso central complexo, por exemplo através de modelos aquáticos como o peixe zebra, invertebrados, modelos de cultivo celular e sistemas de simulação computadorizados. Contudo, os resultados com novos modelos precisam de ser adaptáveis às doenças trombóticas nos humanos.

Para além destas soluções, quando o conhecimento sobre a utilização das células mãe estiver consolidado, a possibilidade de criar órgãos *ex vivo* e testar nestes, poderá constituir uma alternativa importante, pelo seu potencial.

A engenharia genética poderá ser um suporte fundamental para os novos métodos e para os novos fármacos, tendo em conta que não limita a obtenção das amostras para a realização

dos testes da forma mais eficaz possível, assim como também poderá fornecer fármacos que atuem de forma específica para cada doente.

Relativamente ao desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos, os estudos continuam a procurar encontrar respostas aos muitos desafios tais como a administração oral apenas uma vez por dia; a elevada eficácia na redução dos eventos tromboembólicos; a não necessidade de ajuste de dose; a baixa taxa de eventos hemorrágicos; a não necessidade de monitorização da sua ação farmacológica; a pouca interação com alimentos ou outros fármacos; a baixa ligação não-específica às proteínas plasmáticas; a janela terapêutica alargada e por fim, a cinética e resposta à dose previsíveis.

4. BIBLIOGRAFIA

- Adelmann, D., Wiegele, M., Wohlgemuth, R. K., Koch, S., Frantal, S., Quehenberger, P., Schaden, E. (2014). Measuring the activity of apixaban and rivaroxaban with rotational thrombelastometry. *Thrombosis Research*, 134(4), 918–923. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.08.006>
- AFONSO, A., MARQUES, G., GONÇALVES, A., BARROSO, P., GONZALES, A., RODRIGUES, H., & FERREIRA, M. J. (2016). A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento. *Angiologia E Cirurgia Vascular*, 12(3), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.ancv.2016.08.001>
- Badimon, L., Vilahur, G., & Padro, T. (2011). Atherosclerosis and thrombosis: Insights from large animal models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/907575>
- Balsano, F., Rizzon, P., Violi, F., Scrutinio, D., Cimminiello, C., Aguglia, F., Pasotti, C., Rudelli, G. (1990). Antiplatelet Treatment With Ticlopidine in Unstable Angina: A controlled multicenter clinical trial. *Circulation*, 82(1), 17–26.
- Bayer, 2015. Thrombosis Adviser: A Venous & Arterial Thrombosis Resource For Physicians.[Em linha]. Disponível em: <http://www.thrombosisadviser.com/en/understanding-thrombosis/thrombus-formation/> [Consultado em 20 outubro 2017].
- Bhatt DL, Topol EJ. (2003). Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov.*;2:15-28, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd985>.
- Born, B. Y. G. V. R., Cross, M. J., & Fields, I. (1963). THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS From the Department of Pharmacology , Royal College of Surgeons of, 178–195.
- Cato, A., Sutton, L., & Cato III, A. (2002). *Clinical Drug Trials and Tribulations, Revised and Expanded* (Vol. 120). CRC Press.

Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouché A, van den Oord JJ, Kockx M, Collen D. (1997). Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol.*;150:761–776.

Carrillo M, Kim S, Rajpurohit SK, Kulkarni V, Jagadeeswaran P. (2010). Zebrafish von Willebrand factor. *Blood Cells Mol Dis.*;45:326–333. doi: 10.1016/j.bcmd.2010.10.002.

Carty, E., Macey, M., McCartney, S. A., & Rampton, D. S. (2000). Ridogrel, a dual thromboxane synthase inhibitor and receptor antagonist: Anti-inflammatory profile in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(6), 807–817. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00779.x>

Changes, T., Isolated, I. N., & Segments, V. (1952). containing 2, 1011–1014.

Coelho, T. & Moreira, A., (2001). *Função hemostática e a sua avaliação*. Porto: Faculdade de Medicina da Univerdidade do Porto-Serviço de Fisiologia.

Cooley BC. (2011). In vivo fluorescence imaging of large-vessel thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;31:1351–1356. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.225334.

Cooley BC, Daley RA. (1999). Murine microvascular anastomosis model of thrombosis. *Thromb Res.*;96:157–159.

Cooley BC, Szema L, Chen CY, Schwab JP, Schmeling G. (2005). A murine model of deep vein thrombosis: characterization and validation in transgenic mice. *Thromb Haemost.*;94:498–503. doi: 10.1160/TH05-03-0170.

Cooley BC. (2013). Collagen-induced thrombosis in murine arteries and veins. *Thromb Res.*;131:49–54. doi: 10.1016/j.thromres.2012.09.019.

- Cornelissen I, Palmer D, David T, Wilsbacher L, Concengco C, Conley P, Pandey A, Coughlin SR. (2010). Roles and interactions among protease-activated receptors and P2ry12 in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;107:18605–18610. doi: 10.1073/pnas.1013309107.
- Davì G, Patrono C. (2007). Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.*;357:2482-92.
- Day K, Krishnegowda N, Jagadeeswaran P.(2004). Knockdown of prothrombin in zebrafish. *Blood Cells Mol Dis.*;32:191–198.
- Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Culleré M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A.*;95:9524–9529.
- Denis, C., Methia, N., Frenette, P. S., Rayburn, H., Ullman-Culleré, M., Hynes, R. O., & Wagner, D. D. (1998). A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9524–9529. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9524>
- DiMinno, G., & Silver, M. J. (1983). Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 225(1), 57–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6834277>
- Eitzman DT, Westrick RJ, Nabel EG, Ginsburg D. (2000) Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. *Blood.*;95:577–580.
- Eikelboom , J. & Weitz, J., (2010). New anticoagulants. *Circulation*, Volume 121, pp. 1523-3
- Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. (2002). Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse.

Nat Med.;8:1175–1181. doi: 10.1038/nm782.

Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP. (1998). Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation.*;97:1002–1008.

Folts, J. D., Crowell, E. B., & Rowe, G. G. (1976). Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation*, 54(3), 365–370. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.54.3.365>

Garg VP, Halperin JL. (2013). Novel antiplatelet and anticoagulant agents in the cardiac care unit. *Cardiol Clin.*;31:533-44.

Gregory M, Hanumanthaiah R, Jagadeeswaran P. (2002). Genetic analysis of hemostasis and thrombosis using vascular occlusion. *Blood Cells Mol Dis.*;29:286–295.

Gross, P. L., & Weitz, J. I. (2009). New antithrombotic drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 86(2), 139–146. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.98>

Grundel, E., Jenkins, M. Y., & Mitchell, G. V. (1990). Copyright (c) 1990 Pergamon Press plc . All rights reserved ., 10(85), 1035–1044.

Guarino, R. A., & Guarino, R. (Eds.). (2016). *New drug approval process*. CRC Press. - localize e insira na referência as páginas do capítulo que lhe interessa

Gurbel, P. A., Bliden, K. P., Antonino, M. J., Stephens, G., Gretler, D. D., Jurek, M. M., ... Tantry, U. S. (2010). The effect of elinogrel on high platelet reactivity during dual antiplatelet therapy and the relation to cyp 2c192 genotype: First experience in patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(1), 43–53. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03648.x>

Harrington, R. A., Stone, G. W., McNulty, S., White, H. D., Lincoff, A. M., Gibson, C. M., ... Bhatt, D. L. (2009). Platelet Inhibition with Cangrelor in Patients Undergoing PCI. *New England Journal of Medicine*, 361(24), 2318–2329. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908628>

Hughes CE, Radhakrishnan UP, Lordkipanidzé M, Egginton S, DijkstraJM, Jagadeeswaran P, Watson SP. (2012). G6f-like is an ITAM-containing collagen receptor in thrombocytes. *PLoS One.*;7:e52622. doi: 10.1371/ journal.pone.0052622.

Jagadeeswaran, P., Cooley, B. C., Gross, P. L., & Mackman, N. (2016). Animal Models of Thrombosis from Zebrafish to Nonhuman Primates: Use in the Elucidation of New Pathologic Pathways and the Development of Antithrombotic Drugs. *Circulation Research*, 118(9), 1363–1379. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306823>

Jagadeeswaran, P., & Sheehan, J. P. (1999). Analysis of blood coagulation in the zebrafish. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 25(3–4), 239–249. <https://doi.org/10.1006/bcmd.1999.0249>

Jayakumar, T., Chen, W. F., Lu, W. J., Chou, D. S., Hsiao, G., Hsu, C. Y., ... Hsieh, C. Y. (2013). A novel antithrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylate cyclase: Ex vivo and in vivo studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(6), 1086–1095. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.08.007>

Khandekar G, Jagadeeswaran P. (2014). Role of hepsin in factor VII activation in zebrafish. *Blood Cells Mol Dis.*;52:76–81. doi: 10.1016/j. bcmd.2013.07.014.

Khoury, E. M., Gregg, D. E., & McGranahan, G. M. (1971). Regression and reappearance of coronary collaterals. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 220(3), 655-661.

Kogushi, M., Matsuoka, T., Kuramochi, H., Murakami, K., Kawata, T., Kimura, A., ... Hishinuma, I. (2011). Oral administration of the thrombin receptor antagonist E5555 (atopaxar) attenuates intimal thickening following balloon injury in rats. *European Journal of Pharmacology*, 666(1–3), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.034>

Kucheryavenko, A. F., Spasov, A. A., & Smirnov, A. V. (2015). Antithrombotic activity of a new hypoglycemic compound limiglidole in mouse model of cell thrombosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 159(1), 41–43

<https://doi.org/10.1007/s10517-015-2885-x>

Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, Nergiz-Unal R, Prinzen L, Heeneman S, Lutgens E, van Zandvoort MA, Nieswandt B, Egbrink MG, Heemskerk JW. (2009). Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost.*;7:152–161. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03186.x.

Kumar, D. R., Hanlin, E., Glurich, I., Mazza, J. J., & Yale, S. H. (2010). Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology. *Clinical medicine & research*, 8(3-4), 168-172.

Lane, D. & Grant, P., (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*, 1 March, Volume 95, pp. 1517-32.

Larini, L., (2008). *Fármacos e Medicamentos*. Porto Alegre: Artemed.

Lau, A. J., Toh, D. F., Chua, T. K., Pang, Y. K., Woo, S. O., & Koh, H. L. (2009). Antiplatelet and anticoagulant effects of Panax notoginseng: Comparison of raw and steamed Panax notoginseng with Panax ginseng and Panax quinquefolium. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.038>

Lowry O H, Rosebrough N J, F. A. L. & R. R. J. (1977). Citation Classics. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 193(13), 265. <https://doi.org/10.1007/s00540-011-1254-9>

Macedo, T., (2006). Modificadores da hemostase. Em: S. Guimarães, D. Moura & P. Silva, edits. *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas. Manual de Farmacologia e Farmacoterapia*. 5a Edição ed. Porto: Porto Editora, pp. 444-452.

Mangin P, Yap CL, Nonne C, Sturgeon SA, Goncalves I, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Wright CE, Lanza F, Jackson SP. (2006). Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/ FcRgamma deficiency. *Blood*.;107:4346–4353. doi: 10.1182/ blood-2005-10-4244.

- Martinez, B., Baryshnikova, E., Bindi, M. L., & Prisco, D. (2016). Assessment of the Effects of Antithrombotic Drugs. In *Point-of-Care Tests for Severe Hemorrhage* (pp. 173-192). Springer International Publishing.
- Mekhfi, H., Belmekki, F., Ziyat, A., Legssyer, A., Bnouham, M., & Aziz, M. (2012). Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nutrition*, 28(9), 937–941. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.11.032>
- Miranda, T. A., Nader, H. B., Bouças, R. I., & Bouças, T. R. J. (2012). Novas Drogas Antitrombóticas : Comparação Das Atividades Anticoagulante , Antitrombótica E Hemorrágica New Antithrombotic Drugs : Comparison of Anticoagulant , 104–108.
- Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW. (2003) P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg.*;38:1075–1089. doi: 10.1016/S0741.
- Pierangeli SS, Liu XW, Barker JH, Anderson G, Harris EN. (1995). Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.*;74:1361–1367.
- Rodríguez Yunta, E. (2007). Ética De La Investigación En Modelos Animales De Enfermedades Humanas. *Acta Bioethica*, 13(1), 25–40. <https://doi.org/10.4067/s1726-569x2007000100004>
- Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló, M., Rivera-Cervantes, M., ... Sánchez-Mateos, S. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica*, 33(2), 288–299. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2169>
- Rey, M., Kramberg, M., Hess, P., Morrison, K., Ernst, R., Haag, F., ... Steiner, B. (2017). The reversible P2Y₁₂ antagonist ACT-246475 causes significantly less blood loss than ticagrelor at equivalent antithrombotic efficacy in rat. *Pharmacology Research*

& Perspectives, 5(5), e00338. <https://doi.org/10.1002/prp2.338>

Schulz C, Konrad I, Sauer S, Orschiedt L, Koellnberger M, Lorenz R, Walter U, Massberg S. (2008). Effect of chronic treatment with acetylsalicylic acid and clopidogrel on atheroprogession and atherothrombosis in ApoE- deficient mice in vivo. *Thromb Haemost.*;99:190–195. doi: 10.1160/ TH07-03-0235.

Seeley, R., Stephens, T. & Tate, P., (2003). *Anatomia e Fisiologia*. 6a ed. Loures: Lusociência.

Segretin, M. (2002). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *ArgenBio*, (Figura 2), 1–6.

Sikka, P., & Bindra, V. K. (2010). Newer antithrombotic drugs. *Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-Reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 14(4), 188–95. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.76083>

Simoons, M. L. (2001). Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: The GUSTO IV-ACS randomised trial. *Lancet*, 357(9272), 1915–1924. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)05060-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)05060-1)

Singh I, Burnand KG, Collins M, Luttun A, Collen D, Boelhouwer B, Smith A. (2003). Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation.*;107:869–875.

Singh I, Smith A, Vanzielegem B, Collen D, Burnand K, Saint-Remy JM, Jacquemin M. (2002). Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model. *Blood.*;99:3235–3240.

Staton, C. & Lewis, C., (2005). Angiogenesis inhibitors found within the haemostasis. *J*

Cell Mol Med, pp. 286-302.

Terada, N., Yamakoshi, T., Hasegawa, M., Tanikawa, H., Nagata, H., Maesako, K., & Konno, A. (1998). Effect of a thromboxane A2 receptor antagonist ramatroban (BAY u 3405), on inflammatory cells, chemical mediators and non-specific nasal hyperreactivity after allergen challenge in patients with perennial allergic rhinitis. *Allergology International*, 47(1), 59–67. <https://doi.org/10.2332/allergolint.47.59>

Tournoij E, Weber GJ, Akkerman JW, de Groot PG, Zon LI, Moll FL, Schulte-Merker S. (2010). Mlck1a is expressed in zebrafish thrombocytes and is an essential component of thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2010;8:588–595. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03721.x.

Versteeg, H., Heemskerk, J, Levi, M & Reitsma, P,(2013). New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*, 1 January, Volume 93, pp. 327-358.

Walenga, J. M., & Hoppensteadt, D. A. (2005, April). Monitoring the new antithrombotic drugs. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (Vol. 31, No. 02, pp. 247-247). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

Widmaier, E., Raff, H. & Strang, K., (2014). *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. 13 ed. New York: McGrawHill.

ANEXOS

PROCEDIMENTOS DOS MÉTODOS DESCRITOS NO TÓPICO 2.1.

Anexo 1. Modelo intravascular de trombose em cães (Wessler, 1952-62)

Wessler descreveu um modelo bem suportado de estase venosa onde segmentos de vasos sanguíneos, em cães, foram obstruídos por mais de 20 minutos para induzir a formação de coágulos. A tentativa de reproduzir os efeitos trombóticos na circulação sanguínea, teve como problema a reprodução de trombozes e coágulos em animais sob condições controladas. O método utilizou animais saudáveis, de ambos os sexos, com um peso compreendido entre os 9 e 47 kg. Durante o ensaio, os cães foram anestesiados por via intraperitoneal com nembutal, o pescoço e virilha foram raspados e limpos com água e sabão, tendo-se iniciado uma administração intravenosa de solução salina. As veias femoral e jugular externa foram expostas, e todos os vasos que confluem nessas veias foram cuidadosamente ligados com n° 3 Deknatel zero de seda e seguidamente, foram cortados de modo a que os vasos a estudar ficassem inteiramente independentes de estruturas vizinhas. A continuidade de cada veia foi interrompida pela aplicação cuidadosa de uma braçadeira serafine de 27 mm em cada extremidade do segmento tratado. Em animais de maior porte, as veias femorais isoladas passam a ser separadas em duas, e as veias cervical em três segmentos, cada um contendo aproximadamente 1 cm³ de sangue. Após isolamento, os segmentos foram cobertos com gaze, humedecidos com uma solução salina e a ferida foi fechada pela junção da pele e com aplicação de um hemostático. Este procedimento demorou entre uma a duas horas. A hemostasia foi bem conservada, mantendo a temperatura retal, a frequência de pulso e hematócrito constante durante toda a operação. Em intervalos selecionados foram retirados segmentos de veia do animal, e pela liberação de uma braçadeira, os conteúdos foram esvaziados em pratos de vidro contendo 2 a 3 cm³ de solução de citrato de sódio 2,5%. Esses pratos foram cuidadosamente inspecionados quanto à presença ou ausência de um coágulo. Em presença de coágulo, independentemente do tamanho medido, foi tomado como o ponto final do processo. Os segmentos das veias vazias foram abertas e examinadas para ver possíveis coágulos residuais.

Anexo 2. Método turbidimétrico para seguimento de agregação plaquetária com ADP (Born, Cross, & Fields, 1963).

Trata-se de um modelo para testar o ADP como agente gerador de trombos em sangue humano e de suínos, com posterior análise de resultados por densidade ótica, segundo os

ensaios realizados por O'Brien (1962). O sangue humano foi obtido a partir de voluntários aparentemente saudáveis, 1-2 horas após o pequeno-almoço, com uma agulha de aço inoxidável de 1 mm de diâmetro, conectados a um tubo de polietileno de 10 cm. Esta foi inserida na veia ante cubital para obter cerca de 45 ml. A amostra foi distribuída em dois tubos de centrifugação, de acetato de celulose, cada um com 0,8 mL de citrato de sódio a 19 %. O sangue foi misturado imediatamente. Nos suínos, o sangue foi obtido a partir de um matadouro. A cada porco foi aplicado um choque elétrico e, posteriormente pendurado de cabeça para baixo. A garganta foi cortada e, o sangue fora coletado num balde de plástico contendo citrato de sódio a 19 %, o suficiente para originar uma concentração de 0,3 g / 100 mL, quando misturado com o sangue. No espaço de 1 hora, o sangue foi levado para o laboratório e distribuído em tubos de centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 500 g em 20 minutos, à temperatura ambiente (cerca de 20°C). A camada superior, que consistia em 17 mL por tubo de PRP, foi transferido com uma pipeta Pasteur de silicone, para uma proveta graduada de Perspex. A concentração de plaquetas no plasma foi determinada contando em duplicado (Nascido & Gillson, 1959). Cada mililitro continha $2,8 \times 10^8$ plaquetas. Uma vez que a refrigeração promove a agregação plaquetária (Zucker 1961), o sangue e o PRP foram mantidos à temperatura ambiente. As alterações de densidade ótica nas plaquetas foram determinadas à temperatura ambiente, da seguinte forma: visualização e registro de mudanças na densidade ótica do PRP, numa amostra de 3 mL. Esta foi pipetada, para um tubo de acetato de celulose. O tubo foi inserido num absorptiómetro Unicam SP 400, com uma luz de comprimento de onda de 600 μm . Definiu-se a corrente de escuro e a densidade ótica da água destilada em zero. No fundo do tubo utilizou-se uma haste magnética coberta de polietileno para agitar o plasma. A leituras foram registadas após a paragem da agitação e o magneto retirado, de forma a que o seu campo magnético não afetasse o galvanómetro. Todas as adições foram feitas por pipetagem no plasma, enquanto se agitava a amostra. A reprodutibilidade do método foi testada, pela agregação de plaquetas em várias amostras do mesmo plasma, logo após a obtenção do plasma, as leituras de densidade ótica correspondente diferiram em menos de 5%. O plasma obtido na forma descrita era turvo, e a sua turvação foi devida, principalmente às plaquetas, mas por vezes, parte da turbidez foi devida à gordura. Quando o PRP foi centrifugado a 10.000 g por 10 a 15 minutos, as plaquetas sedimentaram, considerando que a gordura permaneceu suspensa. No curso de um dia, a densidade ótica do plasma livre de plaquetas, foi determinado e observou-se lentamente um incremento, por tanto foi determinado tão cedo

como foi possível. No sangue dos indivíduos, a densidade ótica do PRP foi de 2 a 7 vezes maior do que as plaquetas livres no plasma. Na relação entre a concentração de plaquetas determinou-se a densidade ótica de uma amostra de PRP humano; outra amostra do mesmo plasma foi centrifugada a 10.000 g por 20 minutos e a densidade ótica da livre de plaquetas foi determinada. O resto do PRP foi centrifugado a 500 g por 4 períodos sucessivos de 5 minutos. Após cada período, a densidade ótica foi medida, e a concentração de plaquetas, determinado por contagem direta. A concentração de plaquetas, nos indivíduos, indicou que a densidade ótica do PRP é proporcional à concentração das plaquetas. Constatou-se que a adenosina difosfato (ADP) agrega as plaquetas humanas (Gaarder, Jonsen, Laland, Hellem & Owren, 1961); isto foi mostrado por métodos quantitativos. Portanto, o método turbidimétrico descrito anteriormente, foi utilizado para investigar esse efeito quando a ADP foi adicionada à coagulação de plasma citratado, onde se deu a agregação de plaquetas, tal como aconteceu com o cálcio. No entanto, o efeito da ADP foi diferente comparativamente ao do cálcio em dois aspetos: (1) A agregação pode ser provocada pela ADP em todas as amostras com citrato (e, de fato, humanos e suínos heparinizados); (2) A adição de ADP não leva à coagulação. A relação entre concentração e agregação de ADP mostra que, à medida que a concentração de ADP adicionada no plasma foi aumentada, a taxa e a extensão em que as plaquetas se agregaram aumentou. As taxas iniciais de agregação, como indicado pelas diminuições na densidade ótica no primeiro minuto, foram diretamente proporcionais ao logaritmo da concentração de ADP. Para determinar a relação entre concentração e agregação das plaquetas, o plasma humano foi centrifugado a 500 g por períodos sucessivos de 5 minutos para diminuir progressivamente a concentração de plaquetas. Após cada período, adicionou-se 1×10^{-6} M de ADP no plasma. As mudanças resultantes na densidade ótica foram calculadas, como a percentagem das densidades óticas das amostras antes da ADP adicionada; cada leitura da densidade ótica de plasma livre de plaquetas foi registrada. A agregação por ADP foi investigada mais plenamente, visto que resultou nos dois tipos de plasma. Verificou-se que a taxa inicial, de queda na densidade ótica, foi proporcional ao logaritmo da concentração de ADP. Constatou-se ainda que, na presença de concentrações elevadas de ADP, a densidade máxima diminuiu até atingir níveis constantes. A relação entre a densidade ótica e o número e tamanho dos agregados plaquetários, ainda não foi estabelecida. Desconhece-se se as plaquetas se agregam na totalidade ou se formavam pequenos ou grandes aglomerados. Independentemente da relação entre a diminuição da densidade ótica e do tipo de agregados formados, conclui-

se que, o subsequente aumento na densidade ótica, representa a dispersão dos agregados. Este é simplesmente contabilizado pela sugestão (Born, 1962 b), que na adição de ADP é dividido com outras substâncias tais como a AMP e a adenosina, que não só não causa agregação (Gaarder et al. 1961), mas são potentes inibidores da agregação provocada pela ADP.

Anexo 3. Modelo de estudo por obstrução parcial de vasos (Folts et al., 1976). Neste estudo foram utilizados trinta e cinco cães adultos saudáveis, de ambos os sexos, anestesiados com sulfato de morfina (3 mg/kg), seguido de pentobarbital sódico uma hora mais tarde (30 mg/kg). A respiração foi mantida através de um respirador de pressão positiva, e o coração foi exposto através de uma toracotomia esquerda no quinto espaço intercostal. Seguidamente, foram colocadas sondas de fluxo eletromagnética na aorta ascendente e na artéria circunflexa, artéria coronária descendente anterior ou em ambas. O vaso utilizado foi escolhido para fornecer um segmento uniforme, amarrando pequenos ramos laterais, sempre que necessário. Um cateter 23 silastic foi colocado na artéria coronária distal para medição da pressão pelo o método de khouri e Gregg (Khouri, Gregg & McGranahan, 1971). Uma ligadura de seda 2-0 foi colocada sem fazer pressão à volta da artéria coronária abaixo do fluxómetro, de modo a permitir a oclusão completa temporária, de forma a medir a resposta de hiperemia reativa e para a verificação da estabilidade de base. Um cateter cardíaco foi colocado na artéria carótida, com a sua ponta na aorta ascendente, perto da válvula aórtica, para medição da pressão arterial. Duas sondas de ECG foram suturadas no epicárdio na artéria circunflexa e na artéria coronária descendente anterior esquerda, respetivamente. Foram registadas a pressão arterial, o fluxo coronário e o electrocardiograma numa Brush Gould. Em todos os casos, não foi mensurável o gradiente de pressão entre a aorta e a artéria coronária distal antes do estreitamento da artéria coronária. Um cilindro plástico de 2,5 mm de comprimento, projetado para produzir uma redução de 60-80% do vaso, foi colocado à volta da artéria coronária entre a sonda de fluxo e o cateter de artéria coronária. Temos mostrado anteriormente que uma média de 72% de redução suprime a resposta hiperemia reativa. A preparação do animal foi estudada da seguinte forma: Com o cilindro obstrutiva permanentemente em lugar na artéria coronária, o fluxo sanguíneo coronariano foi medida para garantir que o padrão fásico foi em grande parte suprimidos, mas o seu valor médio na faixa normal. A artéria coronária foi totalmente ocluída por 20 segundos em duas ocasiões e a resposta foi medida no fluxo para confirmar que a constrição foi de tal

gravidade para garantir a ausência de hiperemia reativa. A artéria coronária foi ocluída por 5 segundos a cada 15 minutos para verificar a linha de base e a estabilidade. O sangue fluiu, as pressões e os ECG foram monitoradas continuamente durante uma hora. Trinta minutos após a obstrução parcial produzida, durante o período de gravação contínua de 1 hora, uma amostra de 20 mL de sangue venoso foi elaborado numa seringa de plástico para a contagem de plaquetas e de agregação plaquetária. Por fim, a percentagem de obstrução produzida foi determinada da seguinte forma: o vaso era ligado, em primeiro lugar distal e proximal. Seguidamente foi excisado, fixado em formalina a 10%, imerso em parafina e seccionado. Os cortes foram corados com Carstairs para determinar as plaquetas antes do exame microscópico e a percentagem de redução do diâmetro do lúmen foi determinada por medição com um microscópio calibrado. Inicialmente, todos os animais foram tratados da mesma forma, no entanto, acabaram para ser submetidos a três protocolos diferentes para esclarecer os resultados. Grupo I - (heparina e aspirina). Uma hora após o período de observação, foi aplicado 1 mg/kg de heparina intravenosa a 20 cães, seguidamente a pressões sistémica, coronária e o ECG foram registrados continuamente por 30 minutos. Depois, 35 mg/kg de AAS dissolvido em 150 ml de solução salina foi aplicado por via intravenosa durante um período de 15 minutos. Os mesmos parâmetros foram então monitorizados continuamente durante uma hora e meia. Quarenta e cinco minutos após a aspirina, uma segunda amostra 20 ml de sangue venoso fora retirada para estudos de agregação plaquetária. Grupo II - (aspirina). Em dez cães foi aplicado o AAS sem heparina. Após o período de observação de uma hora e meia, 35 mg/kg de AAS foram aplicados como descrito no grupo anterior, realizaram-se observações hemodinâmicas, e a segunda amostra de 20 mL de amostra de sangue venoso foi feita 45 minutos mais tarde para estudos de agregação plaquetária. Grupo III. Em cinco cães mais com preparação tal como descrito no anterior, com reduções cíclicas do fluxo sanguíneo coronariano, foram registrados sem aplicação de aspirina nem heparina. Os animais foram observados com cuidado e numa altura em que o fluxo coronariano tinha chegado a um ponto baixo, e o melhor que poderíamos julgar por observações dos ciclos anteriores no momento imediatamente anterior ao momento em que o fluxo deve aumentar de repente volta para o nível de controlo, o vaso foi cuidadosamente ligado proximalmente e distalmente, em seguida retiradas e imediatamente colocados em formol tamponado a 10%. A seção foi processado e o diâmetro do lúmen medido conforme descrito anteriormente. Posteriormente a estes testes foram estudadas as agregações plaquetárias por meio de amostra de sangue venoso 20 ml, recolhido numa seringa de

plástico e diluída com uma parte de 3,8% citrato trisódico para nove partes de sangue, em um tubo de poliestireno. O PRP foi obtido por centrifugação desta mistura durante 15 minutos à temperatura ambiente. Foram feitos estudos de agregação por uma modificação do método de Born em um Chrono-Log Agregómetro de plaquetas (Chrono-Log Corporation, Broomall, PA).

Anexo 4. Modelo de análise simples para a avaliação de agentes antitrombóticos *in vivo e in vitro* com ratos. (DiMinno & Silver, 1983) Ratos do sexo masculino da espécie Swiss-Webster, com um peso de 25g a 34g. Soluções (0,1 mL) de misturas ou agentes de agregação plaquetária (diluídos em 0,154M de solução de cloreto de sódio) foram injetados num dos quatro ratos, mais propriamente nas veias da cauda, num rácio de 20 μ L/segundo. Os ratos foram mantidos a uma temperatura ambiente de 27°C durante 15 a 30 minutos antes de serem injetados com uma agulha de 27-gauge que foi montada numa seringa plástica de 1 mL. O efeito observado, originado pelo agente trombótico, foi a morte ou paralisia, ou seja, a uma perda de funções dos membros posteriores durante, no mínimo, 15 minutos. A capacidade do agente antitrombótico de proteger os ratos do efeito letal ou paralisia provocado por agentes trombóticos, foi testado administrando estes mesmos agentes antitrombóticos de forma intraperitoneal num volume de 0,4 mL ou menos, durante cerca de 1 hora antes do desafio trombótico. Um exame histológico dos pulmões, coração, fígado, cérebro e rins, foi executado para determinar se os vasos da microcirculação destes órgãos foram obstruídos por trombos constituídos por agregação de plaquetas em resposta a uma injeção de epinefrina-colagénio. Em quanto à medição do risco, o sangue foi recolhido de um grupo de 20 ratos, com uma punção cuidadosa no coração. O sangue (0,9 mL retirados de cada rato para uma seringa de 1 mL contendo uma solução de 0.1 mL de uma solução a 10 U/mL de heparina) foi depositado e centrifugado a uma velocidade de 250 g durante 15 minutos a uma temperatura de 21°C para conseguir extrair um PRP para estudar a agregação e secreção de ATP pelas plaquetas. Nestes estudos foi utilizado um Agregómetro de Lumi como descrito no artigo (DiMinno et al, 1982).

Anexo 5. Modelo de trombose arterial em ratos induzido por cloreto de ferro III. (Grundel, Jenkins, & Mitchell, 1990)

Neste projeto utiliza-se um modelo animal de trombose arterial, com o objetivo de validar uma relação simples entre temperatura e trombose oclusiva, para descrever a composição do trombo, para o estudo de novos agentes antitrombóticos. No modelo, o par termo

elétrico foi aplicado por pequenos transdutores. O dispositivo para aplicar o par termoeletrico foi inserido na artéria carótida de ratos anestesiados e a temperatura do vaso foi registrada de forma contínua. A lesão arterial foi induzida por uma solução de FeCl_3 aplicada topicamente na artéria acima do par termoeletrico. Para validar a relação entre oclusão trombótica do vaso e a temperatura, a velocidade do fluxo sanguíneo e a temperatura proximal à lesão, foram registradas simultaneamente. A temperatura diminuiu rapidamente quando a média da velocidade 24 ± 12 % de controle e a velocidade não diferiram de zero dentro de 20 segundos. Em vasos normais, a média de velocidade de fluxo não diminuiu significativamente do controle até que deu uma redução do diâmetro de estenose de 78% Tempo Médio de Oclusão (TMO), sinalizado pela inflexão de câmbios bruscos de temperatura, variou de 56 ± 4 minutos para 14 ± 1 minuto após 10 e 65% respectivamente da aplicação FeCl_3 . Os segmentos de vasos, foram fixados, varias vezes posteriormente à exposição ao FeCl_3 e foram examinados por microscopia eletrônica. Os danos endoteliais foram observados e associaram-se a com a composição do trombo, a ativação das plaquetas, os filamentos de fibrina e hemácias apresadas. Os resultados demonstraram que o FeCl_3 atua em dose dependente pela indução à formação do trombo oclusivo. Assim a monitorização entre o FeCl_3 aplicado e a descida brusca da temperatura na artéria carótida dos ratos. Na realização deste teste de par termoeletrico e variações na temperatura do vaso, os parâmetros foram monitorados com um dispositivo de aço inoxidável. O transdutor consistiu em tubos hipodermicos (6 hypodermictype ga. 5,16 mm de diâmetro externo x 0,38 mm parede) cortado ao meio no sentido longitudinal e transversalmente para produzir segmentos semicircular 3-4 mm de largura. O par termoeletrico foi isolado com teflon, e o fio foi soldado com prata para dentro da curvatura. A transferência de calor foi limitado do tecido circundante ao dispositivo pelo isolamento de espuma de poliuretano depositado para uma largura de 5 a 6 mm no interior volume semicircular. As extremidades opostas do termopar foram soldadas num conector elétrico apropriado para o dispositivo de gravação. Uma seleção aleatória de termopares foi testada durante a imersão em água através da gravação de tensão de saída de cada sonda em um registrador de gráfico (Beckman R611). A água foi aquecida em banho-maria em uma faixa de 36-39°C. O tempo de resposta do sistema de gravação de termopar foi determinado *in vivo*. O ruído foi eliminado por um filtro de alta frequência (G.G8Hx) do gravador. Após um sinal estável foi gravado, foi emulado por oclusão trombótica ocluindo a carótida com uma temperatura equilibrada na braçadeira microvascular e registrada a temperatura. Os estudos experimentais realizam-se em ratos Sprague-Dawley

machos (375-450g) que foram anestesiados com xilazina (20 mg/kg, s.c.) seguida de ketamina HCl (100 mg/kg, s.c.). Os animais foram fixados e imersos em água, que circula e é mantida em 37°C. A artéria carótida foi abordada através de uma incisão cervical mediana. Cuidadosamente por meio de dissecação consegue-se expor e isolar a carótídea. Uma sutura de seda foi puxado debaixo da artéria para levantar o vaso e inserir um termopar debaixo dela. Assim as mudanças de temperatura foram monitorizadas num registrador gráfico. Pinças pequenas foram usados para mergulho (discos de 3 mm de diâmetro) de papel de filtro Whatman nº 1 em uma solução de FeCl₃. Os discos foram cortados de igual tamanho usando aço inoxidável afiadas 2 tubos de enguia (3 mm i.d.). Um disco saturado foi colocado em cada artéria carótida acima do termopar. O tempo entre a aplicação FeCl₃ e o momento em que a temperatura diminuiu abruptamente foi registado como tempo de oclusão TTO do vaso. Para os vasos que não são ocluídos em 60 minutos, TTO foi atribuído um valor de 60 minutos. O tempo médio necessário para ocluir os vasos foi usado para representar o TTO para cada animal. A associação foi estabelecida entre oclusão do vaso e as mudanças bruscas de temperatura. Uma sonda de fluxo Doppler pulsado foi colocada ao redor a carótida proximal do termopar. A sonda registado alterações na velocidade do fluxo; portanto, ele foi instalado num ponto onde não ocorreu a trombose e o diâmetro do vaso interno manteve-se constante devido a distensão com sangue. Temperatura basal e velocidade de fluxo direcional (fluxómetro Doppler pulsado, modelo 545-C, de Bioengenharia da Universidade de Iowa) foram registradas antes da aplicação do FeCl₃ (35%). Os resultados foram relatados como alteração percentual em valores basais inicial (6 minutos antes da oclusão). O momento em que a temperatura diminuiu rapidamente foi arbitrariamente estabelecida como zero e pré- e pós-occlusão de fluxo, e os valores de temperatura foram referenciados a partir daquele ponto. Estimou-se a descida da velocidade de fluxo segundo o diâmetro da carótida estenosada pela formação dum trombo.

Anexo 6. Modelo de trombose arterial em ratos geneticamente modificados com deficiência no fator von Willebrand. (Denis et al., 1998)

Inicia-se o métodos com a construção do vetor de segmentação e geração de fator von Willebrand (FvW)-Deficient para aplicar nos camundongos. Uma sonda de 161-bp exões 4 e 5 sobreposição de direitos FvW cDNA, que codificam parte do D1 domínio do FvW propolypeptide. Três clones foram isolados, e um fragmento de 7,3 kb BamHI a partir de um desses clones foi identificado contendo os exões 4 e 5 do FvW por Southern blot e

sequenciamento. Estes clones foram selecionados para recombinação homóloga por análise de *Southern blot* usando como uma sonda 600-bp BamHI-SmaI de um fragmento genômico desejado. Uma vez obtidos os ratos geneticamente modificados para comparação entre ratos modificados e os selvagens, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol imediatamente (Aldrich) e o mesentério foi suavemente exteriorizado através de uma incisão abdominal mediana. Arteriolas (60 a 100 μ m de diâmetro) foram visualizadas com uma lente Zeiss Axiovert 135 microscópio invertido equipado com um 100-W lâmpada fluorescente HBO fonte (OptiQuip, Highland Mills, NY) e um tubo de silicone, intensificou a câmara (C 2400; Hamamatsu, Middlesex, NJ) conectado a um gravador de vídeo S-VHS (AG-6730; Panasonic, Matsushita Electric Japão). O vaso sanguíneo foi gravado por 4 minutos, em seguida, FeCl_3 (30 ml de uma solução de 250 mM) (Sigma) foi aplicada no topo da arteriola por superfusão, e gravação de vídeo foi retomada por mais 10 minutos. Foi filmado um vaso sanguíneo por animal. A linha de velocidade eritrocitária mediu-se antes de filmar e 10 minutos depois da lesão por FeCl_3 , utilizando um velocímetro Doppler (Instituto de Pesquisa da microcirculação, Texas A&M College of Medicine). Sobre a formação do trombo foi avaliada num modelo *in vivo*, desenvolvido para este fim. Os camundongos receberam injeção intravenosa de soluções de fluorescência, rotulados plaquetas do mesmo genótipo, e as arteriolas mesentéricas (60-100 μ m de diâmetro) foram examinadas por microscopia intravital. Para estes experimentos, escolheram-se condições hemodinâmicas em que o papel do FvW tem sido demonstrado ser essencial. A média da taxa de corte das arteriolas por estudo foi de $1408 \pm 125 \text{ s}^{-1}$ ($n = 512$), para o mutante, e $1408 \pm 84 \text{ s}^{-1}$ ($n = 515$), para o tipo selvagem. Antes da lesão, não se detetaram interações plaquetárias com a parede de arteriolas no genótipo. A lesão vascular foi induzida pela superfusão de 250 mM de FeCl_3 , que provoca a formação de radicais livres, levando à rutura do endotélio. Nos animais do tipo selvagem, as interações plaquetárias com a parede do vaso lesado começaram muito rapidamente. Dois minutos após a lesão, a maioria das arteriolas (66,6%) do tipo selvagem já apresentou inúmeras interações plaquetária com a parede do vaso, representado na figura 13.

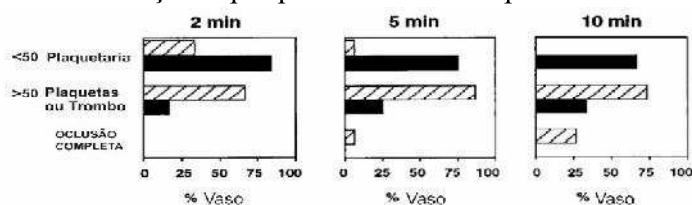


Figura 13. Interações plaquetárias com a parede do vaso após a lesão induzida pelo FeCl_3 . Os tipos selvagem (colunas estriadas, $n = 515$) e deficientes de FvW (preto colunas, $n = 512$) foram injetados com fluorescência e rotulados em correspondência com o genótipo de plaquetas. Arteriolas (60-100 μ m de

diâmetro) foram selecionadas. Qualquer interação plaquetária com a parede do vaso, breve ou estável, foi contabilizada. A presença de trombos plaquetários foi gravada. Para cada vaso estudado, o número total de plaquetas detectadas foi classificado em categorias de tempo, ao longo do período de filmagem, em: primeiros 2 minutos, 5 minutos e 10 minutos (Denis et al., 1998).

Um exemplo de uma arteríola num rato selvagem é apresentada na figura 14A-D, onde podemos seguir o aumento progressivo do número de plaquetas, interagindo com a parede do vaso, levando eventualmente à oclusão completa da arteríola. No final dos 10 minutos de gravação, todas as arteríolas selvagens (+/+) apresentaram ou oclusão completa (25%) ou de plaquetas numerosas interações com a parede do vaso, incluindo formação de trombos (Figura 13). Em contraste, nos animais mutantes (-/-) a interação da maioria das arteríolas (66,6%) foi fraca com a parede do vaso durante todo o período de gravação (Figura 14 E-H).

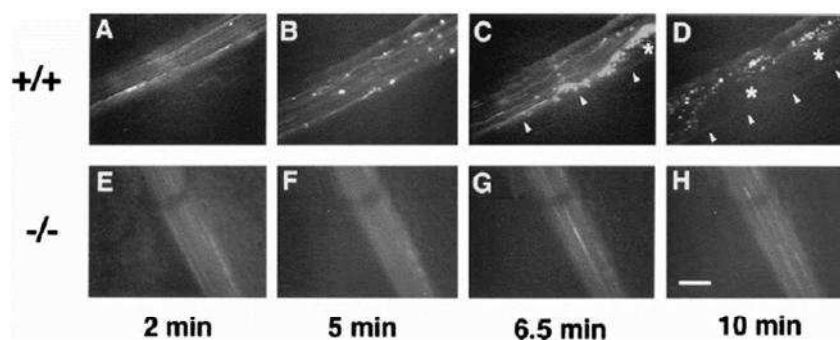


Figura 14. Modelo de trombose *in vivo* nas arteríolas após lesão induzida pelo FeCl_3 . Uma arteríola de um rato tipo selvagem (+/+) ou de um deficiente de FvW (-/-) foi danificada por FeCl_3 e fotografados em quatro pontos de tempo após a lesão. Uma progressão na quantidade de plaquetas interagindo com a parede do vaso foi visível na arteríola selvagem (A-D), levando à oclusão completa e estase sanguínea em D. As setas brancas em C-D mostram bordas do vaso, acima do qual está a formação de trombo. Os asteriscos indicam o centro de um trombo. Quase nenhuma interação plaquetária FvW foi visível na arteríola-deficiente (E-H). (Escala = 50 μm).

A medição da taxa de corte no final do período de 10 minutos indicou que houve uma tendência a uma maior diminuição da taxa de obstrução nas arteríolas dos animais não modificados (cerca de 9,3% de taxa de corte original) em relação aos vasos dos deficientes em FvW (cerca de 13,9% da taxa de corte original); no entanto, esta diferença não foi significativa entre os dois genótipos.