PEQUENAS MOLÉCULAS SULFATADAS: AO SERVIÇO DO CORAÇÃO

MARTA CORREIA DA SILVA*

O impacto que as doenças cardiovasculares têm na saúde pública pode bem ser traduzido pelos 17,3 milhões de mortes por ano, correspondendo à principal causa de morte a nível mundial. Considerando os dados da Organização Mundial de Saúde, que estima que em 2030 este número atingirá os 23,6 milhões, é fácil de pressupor que a investigação nesta área seja de extrema relevância. Embora existam substâncias úteis na terapêutica, há muito a fazer no sentido de se obterem agentes mais eficazes e com menos efeitos secundários. Assim, o trabalho da minha tese de doutoramento consistiu no desenvolvimento de pequenas moléculas como novos agentes antitrombóticos e no estudo do seu potencial como futuras alternativas à terapêutica, dando assim uma contribuição para a resolução desta problemática.

HEMOSTASE: O CANALIZADOR

O sangue possui propriedades fascinantes. Uma das mais curiosas é a sua capacidade de coagular quando há uma rutura vascular. É como se a água das nossas casas fosse capaz de reparar os furos que surgem na canalização que a conduz às torneiras. A hemostase é o nome que se dá a este mecanismo de defesa que, em caso de lesão, permite que os tecidos sejam reparados impedindo a perda excessiva de sangue, comportando-se como um “canalizador”! Este fenómeno, que depende de interações complexas entre a parede dos vasos, as plaquetas, as enzimas e os cofatores, é regulado por diferentes mecanismos que incluem várias fases: constrição do vaso lesado, formação do trombo plaquetário, formação do coágulo de fibrina (coagulação), seguida pela dissolução do coágulo (fibrinólise). Existem vários reguladores do sistema hemostático. A antitrombina III (ATIII) é a principal “controladora” da coagulação. É inibidora de vários fatores intervenientes na coagulação, mais especialmente do fator Xa (FXa) e do fator IIa (FIIa).

Desequilíbrios no sistema hemostático conduzirão a situações patológicas de trombose ou de hemorragia. Cerca

de 90% das doenças cardiovasculares são causadas por eventos trombóticos e 10% causadas por eventos hemorrágicos. O que pode ser feito para prevenir e tratar os eventos trombóticos? Geralmente, no caso da trombose que ocorre nas artérias (trombose arterial), onde o sangue é rico em plaquetas, são utilizados agentes antiagregantes plaquetários. No caso da trombose que ocorre nas veias (trombose venosa), onde o sangue é pobre em plaquetas, são utilizados agentes anticoagulantes. No entanto, muitas vezes, é necessária a sua utilização conjunta.

TERAPÊUTICA ANTITROMBÓTICA: O TAMANHO CONTA?

A terapêutica anticoagulante é caracterizada principalmente pela utilização de açúcares sulfatados: a heparina, as heparinas de baixo peso molecular (HBPM) e o fondaparinux (Figura 1). A heparina exerce a sua ação por se ligar à ATIII e acelerar a sua atividade inibidora do FXa e do FIIa, cerca de 1000 vezes. A heparina comercializada é um produto natural, de fonte bovina ou porcina. A origem animal da heparina acrescenta preocupações relativas a variabilidade estrutural e, conseqüentemente, de efeito biológico, bem como de possível contaminação com patógenos animais. Por outro lado, o elevado número de cargas negativas, conferidas principalmente pelos grupos sulfato (a heparina corresponde à molécula natural com o maior número de cargas

negativas!), conduzem à interação da heparina com um elevado número de proteínas fisiologicamente importantes, originando diversas complicações (hemorragia, toxicidade hepática, osteoporose, ...). O risco de desenvolver estas complicações foi apenas diminuído com as HBPM. Estas são obtidas a partir da heparina, através de modificações químicas e enzimáticas, e correspondem a uma redução substancial do peso molecular relativamente à heparina. As HBPM apresentam valores de inibição do FXa mais acentuados que do FIIa, e dentro destas, a seletividade para o FXa é tanto maior, quanto menor o seu tamanho. A simplificação molecular da heparina para uma sequência de apenas 5 resíduos (pentassacarídeo) levou à síntese do fondaparinux, um inibidor seletivo do FXa (Figura 1). Por sua vez, o fondaparinux é melhor tolerado que as HBPM. No entanto, exige um processo de síntese complexo, o que, somado com o facto de ser de administração parenteral, como as heparinas, torna o seu uso clínico complexo e dispendioso.

A procura de novos agentes anticoagulantes eficazes, com menos efeitos secundários, com uma composição bem definida e síntese eficaz, é assim um forte desafio para a Química Terapêutica. No início da nossa investigação encontramos descritos na literatura alguns estudos relativos à obtenção de pequenas moléculas sulfatadas não glicosiladas, pertencentes à classe química dos flavonóides

* Centro de Química Medicinal da Universidade do Porto (CEQUIMED-UP), Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto
E-mail: m_correiasilva@ff.up.pt

[1], que apesar de apresentarem fraca atividade anticoagulante, foram uma fonte de inspiração para o estabelecimento da nossa estratégia científica.

Estratégia 1: Fármacos já existentes

A nossa estratégia para o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos seria tentar, por um lado, melhorar a potência anticoagulante dos flavonóides sulfatados não glicosilados descritos na literatura, por outro, mimetizar os anticoagulantes polissacarídicos sulfatados da terapêutica, mas minimizando os seus efeitos secundários (Figura 2).

Estabelecemos, para isso, três características estruturais que, estando presentes conjuntamente, nos levariam a cumprir o nosso objetivo (Figura 2):

- possuir grupos sulfato, necessários para a atividade anticoagulante;

- ser uma pequena molécula que, relativamente às macromoléculas na terapêutica, fosse uma estrutura, do ponto de vista de síntese, mais acessível, e que correspondesse a uma estrutura com menos cargas negativas e com um caráter mais hidrofóbico;
- possuir uma porção glicosídica que permitisse, relativamente ao núcleo flavónico, aumentar o tamanho da molécula, pois afinal “pequeno mas nem tanto” e, conseqüentemente, o número de cargas negativas a serem introduzidas e que, por outro lado, permitisse o reconhecimento molecular característico dos anticoagulantes polissacarídicos.

Assim, a nossa ideia inicial foi a de obter flavonóides glicosilados sulfatados [2]. Mas dentro da imensidão de flavonóides glicosilados, quais selecionar para sofrerem modificação molecular por sulfatação? Pensou-se que seria interessante escolher flavonóides gli-

cosilados que se encontrassem na terapêutica [2]. Isto porque a probabilidade de compostos que resultem de modificações moleculares de agentes terapêuticos já existentes virem a ser utilizados em humanos é bem maior, como já dizia Sir James Black, prêmio Nobel em fisiologia e medicina: “A forma mais proveitosa para a descoberta de novos fármacos é começar com fármacos já existentes”. Assim, foram selecionados flavonóides que já eram utilizados em humanos pelas suas propriedades cardiovasculares. Os flavonóides diosmina, hesperidina, rutina e etoxirutina apresentaram-se como candidatos atrativos à sulfatação por serem utilizados na terapêutica como venotrópicos, bem como uma série de outras moléculas pertencentes a outras classes químicas, por serem nutracêuticos (constituintes de alimentos com comprovados efeitos benéficos para a saúde) ou mesmo utilizadas como suplementos nutricionais, pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes [3, 4]. Por outro lado, todas as matérias-primas selecionadas constituíam produtos naturais, o que fazia com que meio caminho já tivesse sido percorrido pela Natureza!

Estratégia 2: OCTOPUS

Ficava agora por definir a estratégia para se avaliar o potencial das pequenas moléculas sulfatadas como futuras alternativas à terapêutica disponível. Para isso seria importante avaliar não só os seus efeitos antitrombóticos *in vitro*, como também antecipar, no processo de descoberta de novos fármacos, a determinação de parâmetros como a estabilidade, a toxicidade e a eficácia *in vivo*. Para tal foi estabelecida uma estratégia com múltiplos tentáculos, avaliando, praticamente em simultâneo, todos os parâmetros citados para cada grupo de análogos químicos desenvolvidos (Figura 3).

SÍNTESE

Foram sintetizados vinte e dois compostos pertencentes a diversas classes químicas [5]. Na Figura 4 encontram-se as moléculas que foram obtidas por sulfatação que, logo à nascerça, já se pareciam muito com os anticoagulantes que conhecemos! Foi

Figura 1 – Anticoagulantes polissacarídicos da terapêutica: a diminuição do tamanho associada ao aumento de seletividade para o FXa

Figura 2 – A estratégia para o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos

utilizado o método de sulfatação com adutos de trióxido de enxofre a 65 °C. O método foi posteriormente melhorado com a utilização de micro-ondas (não tentem isto em casa!), nomeadamente quanto ao tempo de reação (obtenção de derivados sulfatados em apenas 30 minutos em vez de 1 dia, como acontecia com o aquecimento a 65°C).

Os derivados polissulfatados foram obtidos por um processo sintético mais simples que o utilizado para o fondaparinux (podendo mesmo ser efetuado numa só etapa a partir das respetivas matérias-primas), com rendimentos superiores a 80% [6].

AValiação da Atividade na Hemostase

A avaliação do sistema de coagulação pode ser realizada pela determinação dos tempos clássicos de tromboplastina parcial ativado (APTT), de protrombina (TP) e de trombina (TT). Estes testes são realizados em plasma humano e devem ser usados primeiramente para mensurar alterações hemostáticas. Todos os compostos polissulfatados prolongaram os tempos de coagulação, tendo sido mesmo capazes de inibir totalmente a coagulação na concentração mais alta testada. O que isto significa é que os compostos desenvolvidos são capazes de inibir por completo a coagulação e podem ser, por isso, também úteis em procedimentos onde seja necessária a inibição total da coagulação. Perante os resultados obtidos foi possível observar a importância do número de grupos sulfato na atividade anticoagulante. Dentro de cada classe química, quanto maior o número de grupos sulfato, maior o efeito anticoagulante observado. Os compostos mais potentes foram a rutina sulfatada (RS) e a xantona glicosilada sulfatada (XGS), tendo duplicado o APTT numa concentração da ordem dos micromolar e com uma potência muito superior aos flavonóides sulfatados descritos na literatura.

Para os mais céticos, achámos importante avaliar se a atividade anticoagulante seria devida aos compostos polissulfatados sintetizados, às matérias-primas não sulfatadas, ou a pro-

Figura 3 – Estratégia OCTOPUS

Figura 4 – Compostos polissulfatados sintetizados

duto parcialmente sulfatados, formados eventualmente por degradação em contacto com o plasma humano. O que se verificou foi que as matérias-primas não apresentaram qualquer efeito nos tempos de coagulação e os compostos polissulfatados eram estáveis em plasma humano nas condições ensaiadas.

Na tentativa de compreender o mecanismo de ação anticoagulante dos compostos sintetizados, foram realizados ensaios *in vitro* nas enzimas-alvo dos fármacos na terapêutica anticoagulante, o FXa e o FIIa, na presença e na ausência da ATIII. Atualmente, a inibição direta do FXa constitui o mecanismo de ação mais procurado no desenvolvimento de agentes mais eficazes e seguros. De todos os derivados sulfatados testados, nenhum apresentou qualquer influência sobre a atividade de FIIa, mesmo na presença de ATIII. No que se refere à inibição do FXa, tanto os flavonóides (DS, HS, RS, ERS) como as xantonas (XGS, MS) apresentaram seletividade

de para a inibição do FXa. No caso dos flavonóides foi observado que a posição do açúcar sulfatado influenciava a atividade. Enquanto que os flavonóides com o açúcar na posição 3, RS e ERS, apresentaram capacidade de inibir diretamente o FXa, os flavonóides com o açúcar na posição 7, apenas inibiram o FXa na presença de ATIII. No caso das xantonas, a MS apresentou-se como um inibidor direto do FXa e a xantona XGS exibiu um mecanismo duplo.

Seguidamente foi avaliado se o efeito anticoagulante se verificava na presença de todos os componentes do sangue (ou seja, em sangue mesmo!), onde estão presentes células com um papel importante na coagulação e que não se encontram presentes quando se utiliza apenas plasma. Recorremos à tromboelastografia que, para além de utilizar sangue total, é o método que melhor mimetiza a coagulação *in vivo*. Na presença dos compostos sulfatados, foi possível verificar que o tromboelastograma apresentou o per-

fil de um sangue hipocoagulado, com as reações enzimáticas diminuídas, com níveis de fibrinogénio baixos, e com a diminuição do tamanho máximo do coágulo. Este último parâmetro reflete a importante contribuição das plaquetas tendo, por isso, levantado a suspeita de um possível efeito destes compostos, também a nível das plaquetas. Por isso foi seguidamente investigado o efeito dos compostos sulfatados na agregação plaquetária.

Num equipamento designado por multiplate, que também utiliza sangue total, foi verificado que, na presença destes derivados, também a agregação plaquetária era inibida. Esta descoberta significa que os compostos sintetizados poderão vir a permitir a prevenção tanto da trombose arterial como da venosa!

Finalmente, para avaliar a eficácia putativa *in vivo*, foram determinados os tempos de coagulação, bem como a possibilidade de toxicidade hepática, após a administração intraperitoneal dos compostos mais promissores em ratinhos. Ao contrário da heparina, estes derivados foram ativos intraperitonealmente, mostrando um início de ação rápido e uma duração de ação adequada e não foram verificadas alterações nos valores das enzimas

que são libertadas quando há lesão hepática.

CONCLUSÃO

Os novos compostos desenvolvidos combinam atividades anticoagulante e antiagregante plaquetária, e poderão permitir, desta forma, uma nova abordagem terapêutica. É esperado que este tipo de perfil seja vantajoso relativamente à terapêutica de combinação de um anticoagulante e um antiagregante plaquetário, pela sua farmacocinética menos complexa, pela probabilidade de incidência mais baixa de efeitos colaterais e pela menor exigência em fase de estudos clínicos. Estes resultados, acrescidos ao facto de terem apresentado estabilidade em plasma humano e um efeito anticoagulante eficaz após a administração em ratinhos, sem sinais preliminares de hepatotoxicidade, permitiram considerar o seu potencial para virem a constituir alternativas na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Profs. Madalena Pinto e Emília Sousa, aos Profs. Franklim Marques e Félix Carvalho, da FFUP, ao Serviço de Imuno-Hemoterapia, do HSJ, e à FCT (SFRH/BD/22962/2005).

REFERÊNCIAS

- [1] M.E. Sousa, M. Correia-da-Silva, M.M.M. Pinto, 'Sulfated Flavonoids: Nature Playing with the Hydrophilic-Hydrophobic Balance', in G. Brahmachari (Ed.) *Natural products: chemistry, biochemistry and pharmacology* (2008) 392-416.
- [2] M. Correia-da-Silva, E. Sousa, B. Duarte, F. Marques, F. Carvalho, L.M. Cunha-Ribeiro, M.M.M. Pinto, *Journal of Medicinal Chemistry* **54** (2011) 95-106.
- [3] M. Correia-da-Silva, E. Sousa, B. Duarte, F. Marques, L.M. Cunha-Ribeiro, M.M.M. Pinto, *European Journal of Medicinal Chemistry* **46** (2011) 2347-2358.
- [4] M. Correia-da-Silva, E. Sousa, B. Duarte, F. Marques, F. Carvalho, L.M. Cunha-Ribeiro, M.M.M. Pinto, *Journal of Medicinal Chemistry* **54** (2011) 5373-5384.
- [5] M. Correia-da-Silva, 'Synthesis and Biological Activities of Polysulfated Small Molecules: New Cardiovascular Agents', Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2011.
- [6] M.M. Pinto, E. Sousa, M. Correia-da-Silva, F. Marques, F. Carvalho, 'Xantonas Sulfatadas e Análogos Xantónicos Glicosilados Sulfatados com Actividade Anticoagulante e Processos para a sua Preparação', Patente Portuguesa nº 104739, 09 Março, 2011.

ATUALIDADE CIENTÍFICA

ESPECTROMETRIA DE MASSA: UMA NOVA FERRAMENTA NO COMBATE À CONTRAFAÇÃO

A sofisticação cada vez maior na produção de artigos de contrafação é um problema que afeta gravemente o comércio e o crescimento económico e, quando aplicada a produtos farmacêuticos, perigosa para a saúde humana. Deste modo torna-se necessário encontrar novas estratégias para combater o comércio destes artigos. Neste contexto, um grupo de investigadores norte-americanos da Universidade de Massachusetts, Amherst, liderado por Vincent Rotello, conseguiu desenvolver uma tinta na qual incorporou diferentes nanopartículas de ouro. Este 'código de barras' pode ser detetado de uma forma não destrutiva e amiga do ambiente recorrendo à imagem obtida através de espectrometria de massa com dessorção e ionização a laser, que permite determinar a distribuição espacial das partículas com base na sua massa. Comparativamente a métodos mais convencionais, como a cromatografia associada à espectrometria de massa, estes requerem a destruição da amostra para análise, enquanto que as técnicas analíticas não destrutivas geralmente não fornecem informação química específica.

Através da incorporação de ligandos com uma cadeia alquilo de comprimento variável (e, portanto, com diferentes massas) em nanopartículas, é possível pesquisar seletivamente uma massa específica. A combinação das diferentes nanopartículas permite criar uma "assinatura" complexa que pode ser impressa e que só é visível quando todas as nanopartículas estão presentes. Esta tecnologia terá ainda que superar alguns desafios antes da sua aplicação corrente, nomeadamente a impressão da tinta de nanopartículas em materiais fibrosos, tais como os que são utilizados em notas e materiais de embalagem.

(adaptado de <http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2012/April/mass-spectrometry-for-antcounterfeit-packaging.asp>)

Marcelo Vaz Osório (marcelovazosorio@gmail.com)
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto