

Estado da arte na terapêutica anticoagulante: Novas abordagens

Estado da arte na terapêutica anticoagulante: Novas abordagens

Correia-da-Silva, M.¹, Sousa, E.¹, Marques, F.², Pinto, M. M. M.¹

ARTIGO DE REVISÃO | REVIEW ARTICLE

RESUMO

A terapêutica anticoagulante foi, durante muito tempo, limitada ao uso de heparinas e varfarinas. Recentemente foram introduzidas no mercado novas alternativas a esta terapêutica antitrombótica. A disponibilidade para uso oral quer de agentes inibidores do FXa quer da trombina tem proporcionado resultados clínicos revelantes em ensaios para a profilaxia da trombose venosa pós-operatória. No entanto, estes fármacos não apresentam a polifarmacologia única das heparinas. Neste contexto, a investigação de pequenas moléculas sulfatadas que mimetizem as funções dos glicosaminoglicanos, sem os inconvenientes característicos das grandes cadeias de heparinas, tem surgido como uma área de investigação alternativa. Neste trabalho, são expostas as principais abordagens na terapêutica para o tratamento da trombose venosa e é dado um enfoque especial ao estudo desenvolvido no nosso grupo de investigação na procura de pequenas moléculas com atividade dual anticoagulante e antiagregante plaquetária.

Palavras-chave: Terapêutica anticoagulante, Varfarina, Glicosaminoglicanos sulfatados

ABSTRACT

Anticoagulant therapy was for a long time, limited to the use of heparins and warfarins. Recently, has been introduced in the market new alternative antithrombotic to this therapy. The availability of an oral of FXa or thrombin inhibitors has provided relevant clinical results in assays for the prophylaxis of postoperative venous thrombosis. However, these drugs do not have the polypharmacology of heparins. In this context, the investigation of small molecules that mimic the functions of the sulfated glycosaminoglycans, without the drawbacks characteristic of large chain heparins, has emerged as an area of research alternative. In this work, the major therapeutic approaches for the treatment of venous thrombosis are exposed, and is given a special focus to the study of our research group in the search for small molecules active dual antiplatelet and anticoagulant.

Keywords: Anticoagulant therapy, Warfarins, Sulfated glycosaminoglycans

¹Centro de Química Medicinal – Universidade do Porto (CEQUIMED-UP), Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313, Porto, Portugal

²Unidade de Análises Clínicas, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313, Porto, Portugal

Endereço para correspondência: Marta Correia da Silva, Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313, Porto, Portugal.

INTRODUÇÃO

A hemostase é o nome que se dá ao mecanismo de defesa que, em caso de lesão, permite que os tecidos sejam reparados, impedindo a perda excessiva de sangue. 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)¹. Existem vários reguladores do sistema hemostático; a antitrombina III (ATIII) é o principal regulador da coagulação inibindo vários fatores intervenientes, nomeadamente o fator Xa (FXa) e o fator IIa (FIIa).

Desequilíbrios no sistema hemostático conduzem a situações patológicas de trombose ou de hemorragia². Cerca de 90% das doenças cardiovasculares são causadas por eventos trombóticos e 10% causadas por eventos hemorrágicos. 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, em certas situações é necessária a sua utilização conjunta.

Com a introdução de novos fármacos anticoagulantes com novos mecanismos de ação, surge a necessidade de efetuar uma revisão da terapêutica anticoagulante. A Figura 1 representa os atuais agentes anticoagulantes utilizados na terapêutica e os respetivos alvos. Na terapêutica de curta duração, profilática ou de emergência, têm-se utilizado a heparina não fracionada (HNF), as heparinas de baixo peso molecular (HBPM) ou o fondaparinux. Em tratamentos prolongados, são utilizados os antagonistas da vitamina K (AVK) e, mais recentemente, o etexilato de dabigatran, o rivaroxabano e o apixabano, também designados de novos anticoagulantes orais (NOAC).

Assim, são apresentadas cada uma das classes de fármacos anticoagulantes, com referência à classificação química, descrição do mecanismo de ação e principais vantagens e desvantagens.

Com a revelação de outros mecanismos de ação que influenciam a atividade anticoagulante

da heparina, esta tornou-se um modelo interessante na procura de novas alternativas. Assim, no final desta revisão será dado um especial enfoque a uma nova classe de compostos em investigação, os polifenóis oligosacáridos sulfatados que, nos últimos anos, têm sido alvo de estudo pelo nosso grupo de investigação³.

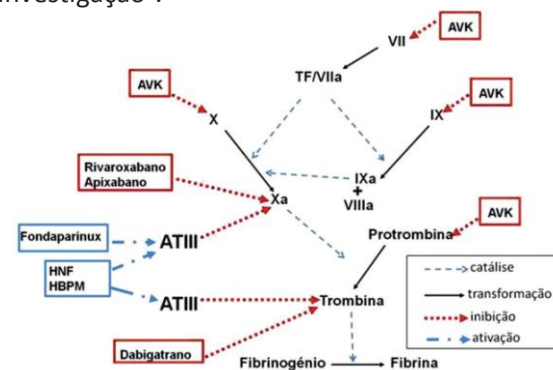


Figura 1. Agentes anticoagulantes utilizados na terapêutica e os respetivos alvos. (AVK, antagonistas da vitamina K; HBPM, heparinas de baixo peso molecular; HNF, heparina não fracionada)

ANTAGONISTAS DA VITAMINA K (AVK)

Os antagonistas da vitamina K (AVK) são usados como anticoagulantes há mais de 60 anos⁴. A descoberta dos AVK surgiu com o aparecimento de uma doença hemorrágica em bovinos, no centro-oeste dos EUA, na década de 1920, após uma população de imigrantes ter destruído uma plantação de gramíneas nativas para construir as suas casas e fazendas. Esta doença foi atribuída à ingestão de trevo doce deteriorado, tendo Karl Link conseguido isolar a substância responsável pela hemorragia. Este estudo conduziu à comercialização do dicumarol, em 1941, e na continuidade, esforços para desenvolver um derivado sintético resultaram na obtenção da varfarina (nome oriundo de Wisconsin Alumni Research Foundation), aprovada para uso médico em 1954.

Os AVK são compostos de baixo peso molecular e de natureza não polissacárida, derivados da 4-hidroxicumarina, com um substituinte aromático volumoso na posição 3 (Figura 2). Estes dois requisitos estruturais, um substituinte volumoso na posição 3 e o grupo hidroxilo na posição 4, são essenciais para a atividade anticoagulante desta classe de compostos. Os AVK têm propriedades farmacocinéticas e efeitos secundários semelhantes entre si⁵, sendo a varfarina o AVK mais frequentemente usado.

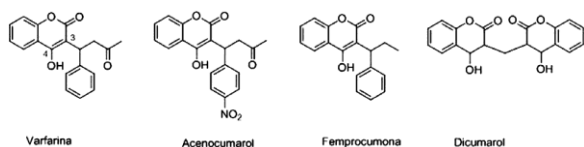


Figura 2. Antagonistas da vitamina K (AVK) em uso clínico.

Os AVK inibem, no fígado, a epóxido redutase da vitamina K e a carboxilação da vitamina K-dependente dos fatores de coagulação protrombina, FVII, FIX, FX. Subsequentemente, os fatores de coagulação parcialmente carboxilados apresentam um efeito coagulante reduzido. Os AVK correspondem ao tratamento padrão para a profilaxia a longo prazo, de acidentes vasculares cerebrais (AVC), em pacientes com fibrilação atrial. No entanto, os AVK estão associados a um conjunto considerável de limitações (Tabela 1). Os AVK apresentam uma janela terapêutica estreita, bem como a necessidade de uma monitorização frequente da coagulação e de ajustes de dosagem. A hemorragia é o efeito adverso mais comum com os AVK⁶. Além disso, estes agentes possuem um efeito lento, quer no aparecimento quer no desaparecimento do efeito anticoagulante, o que implica a associação de heparinas durante a fase inicial do tratamento. O metabolismo dos AVK é afetado por fatores genéticos, ou seja, por exemplo pelos polimorfismos da enzima CYP2C9. Adicionalmente, a lista extensa de interações com medicamentos e alimentos ricos em vitamina K, limitam grandemente o seu uso.

ATIVADORES DA ANTITROMBINA III (ATIII) Heparina não fracionada (HNF)

A HNF tem sido utilizada para a prevenção e tratamento de trombose, desde a década de 1930⁷. A HNF é um produto natural, de fontes bovina ou porcina, que contém uma mistura de cadeias de polissacáridos de diferentes tamanhos (número de resíduos entre 10 e 80) e uma diferente distribuição dos grupos sulfato. O peso molecular médio de 15.000, implicando a presença de cerca de 65-85 cargas negativas, em média, por cadeia (Figura 3).

A HNF aumenta significativamente a taxa de inibição, por parte da ATIII, de várias enzimas da coagulação, incluindo a trombina, o FXa, FIXa, FXIa, FXIIa e TF/FVIIa, sob condições fisiológicas. A trombina e o FXa são os mais sensíveis à inibição pelo complexo HNF/ATIII, sendo este o principal mecanismo envolvido na ação antico-

agulante da HNF⁸. Para catalisar a inibição da trombina, a HNF liga-se à ATIII, através de uma sequência pentassacárida DE-FGH, e simultaneamente à trombina. Em contraste, para promover a inibição do FXa, a HNF necessita apenas de se ligar à ATIII através da sua sequência pentassacárida. As cadeias de HNF contendo 18 unidades sacarídicas são demasiado curtas para se ligarem a ambas, trombina e ATIII e, portanto, não podem catalisar a inibição da trombina. No entanto estes fragmentos mais curtos de HNF

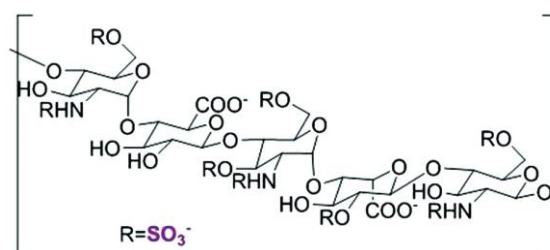


Figura 3. Heparina não fracionada (HNF).

podem catalisar a inibição do FXa. Como quase todas as cadeias de HNF são de comprimento suficiente para fazer a ponte da ATIII à trombina, a HNF promove a inibição da trombina e FXa igualmente bem e é atribuída uma proporção de anti-FXa de antitrombina de 1,25⁹. A HNF é um agente parentérico, administrado quer por via intravenosa ou subcutânea⁷. Geralmente, a HNF tem um início de ação imediato e uma curta duração de ação, embora a semi-vida biológica da HNF seja variável e dependente da dose administrada e da via de administração. A administração intravenosa provoca níveis iniciais elevados, com um tempo de semi-vida curto (1 hora). A administração subcutânea conduz à libertação lenta de HNF e tem um efeito equivalente à HNF intravenosa na profilaxia da trombose. Os problemas da terapêutica com HNF resultam da sua estrutura molecular. Os extensos fragmentos de cadeias altamente aniónicas são responsáveis por um grande número de interações com proteínas plasmáticas, o fator 4 das plaquetas, macrófagos hepáticos, osteoblastos, osteoclastos e células endoteliais. Estas interações limitam a biodisponibilidade e conduzem a uma resposta anticoagulante altamente variável, sendo causadoras dos efeitos adversos da HNF, tais como, complicações hemorrágicas, trombocitopenia induzida pela heparina (HIT)¹⁰ e o aumento significativo dos valores das transaminases hepáticas¹¹.

A adicionar ao seu caráter polianiónico, a HNF apresenta milhões de seqüências que diferem umas das outras na posição dos grupos sulfato, gerando considerável micro-heterogeneidade e polidispersidade. Essa complexidade estrutural da HNF também oferece caminhos para utilização em doping¹², como o demonstrado pelos acontecimentos recentes em que um contaminante¹³ presente na HNF comercial levou a várias mortes nos EUA. Além disso, a origem animal deste fármaco é uma causa de preocupação no que diz respeito à contaminação com agentes potencialmente infecciosos de origem vírica.

Heparinas de baixo peso molecular (HBPM)

Nas últimas décadas assistiu-se à introdução de várias HBPM, que ganharam maior aceitação para uma série de indicações, nomeadamente, em pacientes que sofrem de HIT. As HBPM (Figura 4) em uso incluem a enoxaparina, a dalteparina, a nadroparina, a tinzaparina, a reviparina e a parnaparina.

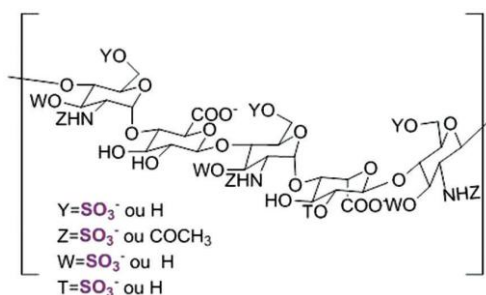


Figura 4. Heparinas de baixo peso molecular (HBPM).

As HBPM derivam da HNF por despolimerização enzimática ou química. Estes derivados correspondem a uma diminuição no peso molecular de cerca de um terço da HNF (~ 2000-5000 Da; média de 3000 Da) e apenas 25% a 50% das moléculas de HBPM contêm um número de sacáridos igual ou superior a 18. Por conseguinte, pelo menos metade das cadeias de HBPM são demasiado curtas para se ligarem simultaneamente à trombina e à ATIII. Assim, as HBPM têm menor atividade contra a trombina que a HNF. Em contraste, retêm a ação inibitória contra o FXa¹⁴, apresentando índices de aceleração da inibição do FXa versus da trombina que variam de 2:1 a 4:1¹⁴.

Quando comparadas com HNF, as HBPM apresentam uma reduzida ligação às proteínas do plasma, plaquetas e outras células. As HBPM são caracterizadas, em doses baixas, por possuí-

rem uma maior biodisponibilidade, um maior tempo de semi-vida e um efeito dose-resposta mais previsível que a HNF. O risco de desenvolver complicações hemorrágicas e incidência de HIT em resposta à terapêutica com HBPM é diminuído apesar de ainda existir¹⁴. Quando as HBPM são utilizadas no tratamento da trombose venosa profunda é observada hepatotoxicidade, definida como a elevação de transaminases hepáticas maior do que três vezes o limite superior do normal¹¹. As HBPM ainda são heterogêneas em termos de atividade biológica e duração de ação. Cada HBPM tem um peso molecular específico que determina a sua atividade anticoagulante e duração de ação, de modo que cada agente é considerado um medicamento único. Devido ao seu modo de ação dependente da ATIII, a HNF e as HBPM não são capazes de inativar a trombina ligada à fibrina ou o FXa ligado às plaquetas ativadas.

Fondaparinux

As vantagens farmacocinéticas e biológicas das HBPM relativamente à HNF têm estimulado o interesse em fragmentos de HNF ainda menores. A descoberta, nos anos 1980, de que um domínio de apenas cinco resíduos (DEFGH) na HNF ativava a ATIII para acelerar a inibição do FXa, mas não da trombina, conduziu à síntese de uma única seqüência pentassacarídica, o fondaparinux (Figura 5). A primeira síntese química do pentassacárido compreendeu mais de 60 passos e este foi produzido com rendimento e pureza suficientes para utilização como fármaco. Apesar da sua síntese em larga escala ser realizada com sucesso na indústria, ainda hoje compreende várias etapas. O fondaparinux chegou ao mercado nos EUA e na Europa em 2002¹⁵.

O fondaparinux só potencializa a taxa de neutralização de FXa pela ATIII e, ao contrário da HNF e das HBPM, não inativa a trombina. A inibição seletiva do FXa faz do fondaparinux um anticoagulante melhor tolerado do que a HNF e as HBPM. O fondaparinux não tem nenhum efeito conhecido na função plaquetária, atividade fibrinolítica ou no tempo de hemorragia; o

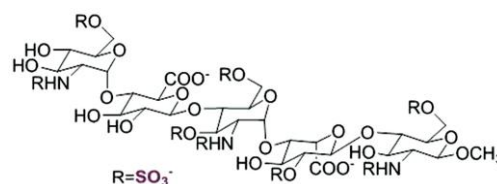


Figura 5. Fondaparinux

fondaparinux não induz toxicidade hepática¹⁶ e, como não se liga ao fator 4 das plaquetas, tem sido utilizado com sucesso para tratar doentes com HIT¹⁷. O fondaparinux é preferencialmente recomendado nas diretrizes recentes para o tratamento antitrombótico devido à sua eficácia e perfil de segurança favorável, assim como ao facto de se apresentar numa dose única diária, sem necessidade de monitorização. No entanto, o fondaparinux mantém o risco de hemorragia, como o observado nos pacientes tratados com HBPM; no caso de uma hemorragia não controlável, o FVIIa recombinante pode ser eficaz¹⁸.

A necessidade de administração parentérica subcutânea¹⁹ torna o fondaparinux um fármaco inconveniente e dispendioso. Além disso, o fondaparinux não inibe o FXa ligado ao complexo de protrombinase e é dependente da ATIII.

Inibidores diretos de fatores de coagulação

No que diz respeito à inibição direta da coagulação, foram propostos como alvos a trombina e o FXa. Os inibidores diretos da trombina e do FXa podem ligar-se diretamente à trombina e ao FXa, respetivamente, enquanto que os inibidores indiretos são dependentes da ATIII. Estes fármacos inibidores diretos de trombina e de FXa formam uma grande classe de reguladores da coagulação que são considerados superiores às heparinas uma vez que inibem ambas as enzimas circulantes e ligadas ao coágulo²⁰. No entanto, carecem dos efeitos polifarmacológicos das heparinas, nomeadamente das suas propriedades anti-inflamatórias, antiangiogénicas, etc.

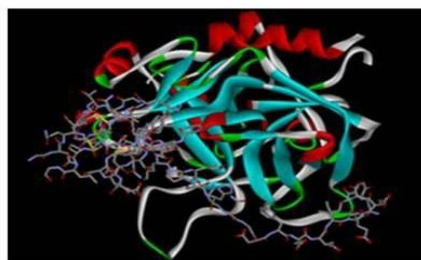
Inibidores diretos da trombina (IDT)

Os inibidores diretos da trombina (IDT) ligam-se à trombina e bloqueiam a sua interação com os seus substratos, a formação de fibrina e a ativação de plaquetas e dos FV, FVIII, FXI e FXIII21.

A trombina é o agonista mais potente da ativação das plaquetas. Através da ativação dos recetores ativados por protease (PAR), presentes na superfície das plaquetas, conduz à libertação de grânulos e à agregação das plaquetas através dos recetores GPIIb/IIIa. Assim, anticoagulantes que inibem a atividade da trombina reduzem a ativação plaquetária através dos recetores PAR. Estes fármacos também podem inibir as vias intracelulares de transdução do sinal induzidas pela trombina, incluindo a ativa-

ção das plaquetas induzida pela trombina. Existem dois tipos de IDT, dependendo da interação que estabelecem com a molécula de trombina. Os IDT bivalentes (hirudina, lepidurina, bivalirudina) ligam-se tanto ao local ativo como ao exossítio¹, enquanto que os IDT univalentes (argatrobano, melagatran, dabigatran) ligam-se apenas ao local ativo. A hirudina, a lepidurina, a bivalirudina e o argatrobano são IDT de administração parenteral. A hirudina é um péptido de origem natural proveniente das glândulas salivares de sanguessugas (tais como *Hirudo medicinalis*) (Figura 6 A). A bivalirudina é uma forma quimicamente derivada da hirudina e a lepidurina uma forma recombinante da hirudina. O argatrobano é uma pequena molécula inibidora direta da trombina (Figura 6 B). Os IDT parenterais são geralmente reservados para o tratamento de pacientes com HIT. A principal limitação da sua ação é a ocorrência de hemorragias²².

A. Hirudina



B. Argatrobano

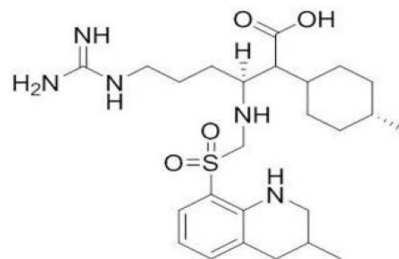


Figura 6. Inibidores diretos da trombina (IDT) parenterais. A. Hirudina ligada à trombina (imagem de PDB; 4HTC). B. Estrutura do argatrobano.

O primeiro IDT disponível (2003-2006) para uso clínico por via oral foi o ximelagatran (Figura 7), um pró-fármaco do melagatran. O aparecimento deste medicamento representou um grande avanço em relação aos AVK orais existentes, pois não exigia monitorização ou ajuste de dose²³. Em ensaios clínicos para o tratamento e prevenção de tromboembolismo venoso, o ximelagatran demonstrou ser mais eficaz ou comparável à varfarina²³. No entanto,

o uso deste fármaco foi suspenso em 2006 devido a toxicidade hepática observada²⁴. Em março de 2008, um segundo inibidor direto da trombina por via oral, o etexilato de dabigatrano (Figura 7), foi aprovado para comercialização na Europa²⁵.

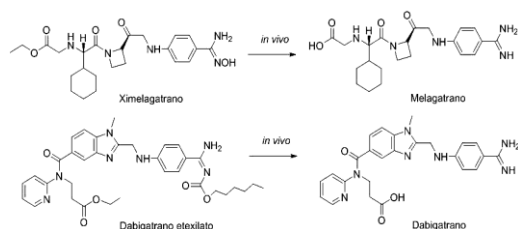


Figura 7. Inibidores diretos da trombina (IDT) e respetiva bioativação.

O etexilato de dabigatrano é um duplo pró-fármaco que, após administração oral, é rapidamente absorvido e por hidrólise, catalisada por esterases no plasma e fígado, convertido na sua forma ativa, o dabigatrano (Figura 7). Este novo anticoagulante não apresenta os problemas dos AVK, no que concerne as interações com medicamentos e/ou alimentos. Há que referir a possibilidade de aumento de hemorragia com o uso concomitante com fármacos que bloqueiam a agregação plaquetária, como os anti-inflamatórios não esteróides. Por outro lado, o etexilato de dabigatrano é um substrato da glicoproteína P, pelo que inibidores desta bomba de efluxo reduzem a sua eficácia (ex. amiodarona, cetoconazol, quinidina).

Inibidores diretos do FXa

O FXa é o local primário de amplificação no processo da coagulação: uma molécula de FXa catalisa a formação de cerca de 1000 moléculas de trombina²⁶. Os inibidores de FXa inibem a formação de trombina, de forma potente e seletiva, em vez da atividade da trombina. Por esta razão, o desenvolvimento de fármacos que inibam o FXa é uma estratégia promissora na investigação farmacêutica. Uma vez que a intervenção do FXa fora da coagulação é menor do que a da trombina, estes inibidores têm uma janela terapêutica mais larga do que os inibidores da trombina e, aparentemente, não conduzem, após a interrupção, à hipercoagulabilidade, regularmente observada após a paragem dos inibidores de trombina.

O rivaroxabano é um derivado da oxazolidona (Figura 8), um inibidor direto competitivo do FXa e altamente seletivo, que foi

aprovado, em setembro de 2008, na Europa, para a prevenção do tromboembolismo venoso em pacientes submetidos a cirurgia ortopédica^{27,28}. O rivaroxabano não apresenta interações com alimentos, como os AVK; no entanto, possui interações com alguns medicamentos inibidores da glicoproteína P, inibidores da protease e com inibidores potentes do CYP3A4 (ex. rifampicina). Em maio de 2011, outro inibidor oral do FXa, o apixabano (Figura 8), foi aprovado na Europa para a prevenção de tromboembolismo venoso após artroplastia eletiva da anca ou joelho²⁹. O sucesso do apixabano na prevenção de AVC em pacientes com fibrilação atrial, nos quais o tratamento convencional com AVK está contra-indicado, foi descrito recentemente³⁰.

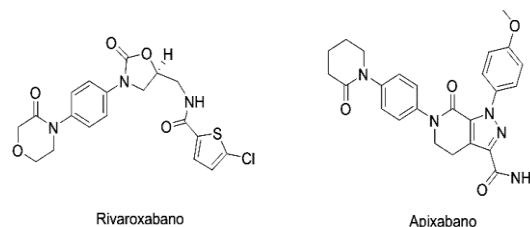


Figura 8. Inibidores diretos do FXa: rivaroxabano e apixabano.

Na Tabela 1 são resumidas as principais vantagens e desvantagens dos anticoagulantes de utilização clínica.

EM INVESTIGAÇÃO: NOVA CLASSE DE POLIFENÓIS OLIGOSSACÁRIDOS SULFATADOS

Embora existam substâncias úteis na terapêutica, há ainda muito a fazer no sentido de se obterem agentes mais eficazes e com menos efeitos secundários. Uma lição importante que surgiu a partir dos numerosos ensaios antitrombóticos é que só o aumento da potência antitrombótica por si só não garante necessariamente um maior benefício clínico e, em geral, as abordagens com antitrombóticos potentes devem ser reservadas para pacientes de alto risco. A ocorrência de hemorragias representa o fator mais importante que influencia a terapêutica a longo prazo e o benefício clínico global da terapêutica antitrombótica. A principal preocupação em relação aos fármacos antitrombóticos existentes relaciona-se com a janela terapêutica e a necessidade de monitorização. Assim, os principais desafios no desenvolvimento destes inibidores, incluem atingir uma afinidade de

Tabela 1. Agentes anticoagulantes na terapêutica

	Administração	Vantagens	Desvantagens	Antídoto
ATIVACÃO DA ATIII				
HNF	i.v. (2 ou 3 vezes por dia)	Rápido início/fim de ação Pode ser usada na gravidez	Administração parenteral Depende da ATIII Origem animal Complicações hemorrágicas Monitorização HIT severa (4-5 dias) Ativação plaquetária	Sulfato de protamina
HBPM	s.c. (2 ou 3 vezes por dia)	Não requer monitorização	Administração parenteral Depende da ATIII Origem animal Complicações hemorrágicas Risco de HIT	Sulfato de protamina
Fondaparinux	s.c. (1 vez por dia)	Não requer monitorização Origem sintética Não se observa HIT	Administração parenteral Depende da ATIII Complicações hemorrágicas em pacientes com insuficiência renal	FVIIa recombinante
AVK				
Varfarina	oral (1 vez por dia)	Administração oral Tratamento prolongado Baixo custo	Início de ação lento Complicações hemorrágicas Requer monitorização Teratogénico Polimorfismo Interações com medicamentos e alimentos	Vitamina K Plasma fresco FIX/protrombina
IDT				
Hirudina, Lepirudina, Bivalirudina	i.v.	Não se observa HIT	Administração parenteral Episódios hemorrágicos graves	Sem antídoto
Argatrobano Etelixato de dabigatran	oral (2 vezes por dia)	Administração oral	Experiência clínica reduzida	Sem antídoto
INIBIDORES DIRETOS DO FATOR Xa				
Rivaroxabano	oral (1 vez por dia)	Rápido início/fim de ação Resposta previsível Interações com medicamentos e alimentos pouco relevantes	Experiência clínica reduzida	Sem antídoto
Apixabano	oral (2 vezes por dia)	Rápido início/fim de ação Resposta previsível Interações com medicamentos e alimentos	Experiência clínica reduzida	Sem antídoto

Legenda: HBPM, heparinas de baixo peso molecular; AVK, antagonistas da vitamina K; IDT, inibidores diretos da trombina; i.v., intravenoso; s.c., subcutâneo; HIT, trombocitopenia induzida pela heparina.

ligação para as enzimas da coagulação que não esteja associada com um efeito hemorrágico excessivo e evitar a toxicidade hepática. Numerosas substâncias com atividade anti-trombótica com ação em vários outros alvos, no

meadamente no co-fator da heparina (HCII), proteína C, FIX, FVII, FXIa³¹⁻³³, encontram-se atualmente em diferentes etapas de desenvolvimento.

No entanto, na última década, com a

descoberta de um conjunto de mecanismos envolvidos na atividade anticoagulante da HNF³⁴, vários esforços têm sido dirigidos na procura de miméticos da heparina, mas que apresentem uma composição bem definida, síntese eficaz, menores efeitos secundários e uma resposta terapêutica previsível, sem necessidade de monitorização. Podem destacar-se, nomeadamente, as tentativas de obtenção de heparina totalmente sintética, de oligossacáridos miméticos da heparina³⁵⁻³⁷, bem como tentativas de desenvolvimento de formulações de heparina oralmente ativa³⁸.

No nosso grupo de investigação temos vindo a desenvolver nos últimos anos pequenas moléculas com atividade antitrombótica no sentido de mimetizar as funções dos anticoagulantes polissacáridos sulfatados da terapêutica³⁹.

Assim, foram definidas três características estruturais essenciais: i) possuir grupos sulfato, necessários para a atividade anticoagulante; ii) ser uma pequena molécula que, relativamente às macromoléculas da terapêutica, corresponda a uma estrutura, do ponto de vista de síntese, mais acessível, contendo um menor número cargas negativas e um caráter mais hidrofóbico, no sentido de minimizar os seus efeitos secundários; iii) e possuir uma porção glicosídica que consinta aplicar o princípio da extensão molecular e aumentar o número de cargas negativas permitindo assim o reconhecimento molecular característico dos anticoagulantes polissacáridos.

Assim, foi selecionado um conjunto de pequenas moléculas glicosiladas, que se encontrasse na terapêutica, para submeter a modificação molecular por sulfatação. Isto porque a probabilidade de compostos que resultem de modificações moleculares de agentes terapêuticos já existentes poderem também virem a ser utilizados em humanos é elevada. Como já dizia Sir James Black, prémio Nobel em fisiologia e medicina (1988): “A forma mais proveitosa para a descoberta de novos fármacos é começar com fármacos já existentes”⁴⁰. Pelo exposto, foram selecionados flavonóides utilizados na terapêutica como venotrópicos, nomeadamente, a diosmina (D), a hesperidina (H), a rutina (R) e a etoxirutina (ER)⁴¹, bem como uma série de outras moléculas pertencentes a outras classes químicas (Figura 9), por serem utilizadas como nutracêuticos ou suplementos nutricionais, pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes,

como por exemplo, o glucosídeo de *trans*-resveratrol (SB), a mangiferina (M), etc^{42,43}.

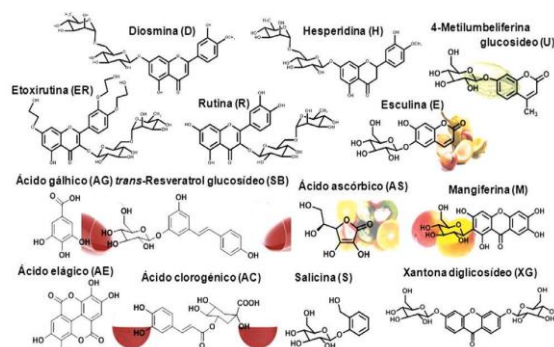


Figura 9. Matérias-primas selecionadas para sulfatação.

Os derivados polissulfatados (Figura 10) 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%⁴¹⁻⁴³.

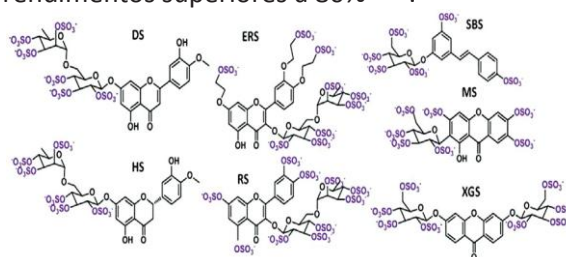


Figura 10. Alguns exemplos de novas pequenas moléculas sulfatadas sintetizadas com propriedades anticoagulantes.

No que diz respeito aos tempos clássicos de coagulação, todos os compostos polissulfatados prolongaram os tempos de coagulação *in vitro*, em contato com plasma humano, e dentro de cada classe química foi possível observar uma relação estrutura-atividade que evidenciou a importância do número de grupos sulfato⁴¹⁻⁴³. O tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) e o tempo de protrombina (TP) foram os testes que apresentaram maior sensibilidade à presença dos compostos sulfatados. Os compostos mais potentes foram a rutina persulfatada (RS)⁴¹ e a 3,6-(O-D-glucopiranosil) xantona persulfatada (XGS)⁴³ (Figura 10), tendo duplicado o APTT numa concentração da ordem dos micromolar. No entanto, com concentrações mais altas, os compostos ERS, RS⁴¹, MS e XGS⁴³ interferiram também com o tempo de trombina (TT). Os tempos clássicos de coagulação, após a administração intraperitoneal em ratinhos, foram também avaliados para três dos compostos

polissulfatados (DS, RS, MS)^{41,43}, tendo sido observado um prolongamento do APTT para níveis terapêuticos (2,5-3 vezes superior ao valor normal do APTT) logo após 30 minutos. Os compostos demonstraram provocar uma hipocoagulação com duração de ação adequada, uma vez que, após 120 minutos, os tempos de coagulação ainda se encontravam prolongados. Os níveis das necroenzimas hepáticas foram também avaliados ao longo do ensaio in vivo e não foram observados sinais de hepatotoxicidade.

A capacidade anticoagulante dos compostos DS, ERS, RS, HS, SBS, MS e XGS⁴¹⁻⁴³, na presença de sangue total humano foi avaliada por tromboelastografia, tendo o tromboelastograma apresentado um perfil de hipocoagulação, sem sinais de fibrinólise.

Relativamente ao possível mecanismo de ação justificativo da atividade anticoagulante, nenhum dos compostos apresentou qualquer influência sobre a atividade da trombina, mesmo na presença de ATIII. No entanto, alguns derivados sulfatados, DS, HS, ERS, RS, MS e XGS, mostraram seletividade para o FXa (direta ou indiretamente) tendo sido observadas algumas características interessantes de relação estrutura-atividade, no que se refere à classe química e à posição do açúcar: enquanto que os flavonóides polissulfatados 3-rutinosídeos ERS e RS⁴¹ e a mangiferina sulfatada MS⁴³ foram inibidores diretos do FXa, os flavonóides polissulfatados 7-rutinosídeos DS e HS foram inibidores do FXa através da ativação da ATIII⁴¹. A xantona XGS apresentou um perfil diferente exercendo atividade inibidora do FXa tanto na presença como na ausência de ATIII⁴³.

A agregação plaquetária foi também avaliada na presença dos compostos sulfatados, em sangue total, através da medição dos tempos de oclusão do colagénio/5'-difosfato de adenosina (COL/ADP) e colagénio/epinefrina (COL/EPI) e por agregometria por impedância elétrica induzida pelo péptido de ativação do recetor de trombina (teste TRAP), pelo ácido araquidónico (teste ASPI) e pelo 5'-difosfato de adenosina (teste ADP). Ambos os tempos de oclusão COL/ADP e COL/EPI apresentaram-se prolongados na presença dos flavonóides polissulfatados ERS e RS⁴¹, do resveratrol persulfatado SBS⁴², e da xantona glicosilada persulfatada XGS⁴³. Na presença das diosmina e hesperidina hexasulfatadas (DS e HS)⁴¹ e da mangiferina heptasulfatada (MS)⁴³, o tempo de oclusão

COL/EPI permaneceu dentro dos valores normais enquanto o tempo de oclusão COL/ADP foi alterado, sendo este um perfil característico por exemplo, do clopidogrel. Alguns compostos sulfatados, DS, ERS, RS, HS, SBS, MS e XGS, inibiram a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidónico (teste ASPI), à semelhança do ácido acetilsalicílico, e pelo 5'-difosfato de adenosina (teste ADP).

A descoberta que os compostos DS, ERS, RS, HS, SBS, MS e XGS apresentavam simultaneamente atividades anticoagulante e antiagregante plaquetária, aumentou as expectativas relativamente aos seus benefícios clínicos. Este tipo de perfil é 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. Assim, os compostos sintetizados podem ser úteis concomitantemente na trombose arterial como na venosa, podendo vir, por isso, a constituir uma nova abordagem na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares³⁹.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A introdução das HBPM e do fondaparinux simplificou a terapêutica anticoagulante parenteral e estes agentes têm substituído a HNF para muitas indicações. Inesperadamente, foi provado que o pentassacárido sintético, fondaparinux, produz grandes problemas de hemorragia em doses mínimas⁴⁴. Assim, a sua utilização tem sido reservada apenas para casos de desenvolvimento de HIT.

O desenvolvimento de novos anticoagulantes orais para substituir os AVK em ambulatório em tratamentos prolongados de doenças trombóticas tem sido mais lento do que o dos agentes parenterais. Os AVK, como a varfarina, apresentam a vantagem da administração oral, mas devido ao seu início de ação lento, não dispensam administração dos anti-coagulantes citados anteriormente, na fase inicial do tratamento. Para além disso, apresentam várias interações com medicamentos e alimentos e originam respostas com grande variabilidade inter-individual, requerendo monitorização da resposta terapêutica, o que conduz frequentemente à falta de adesão do doente. Com o objetivo de ultrapassar estas desvantagens, desenvolveram-se os NOAC. Foram introduzidos na terapêutica

para uso oral quer agentes inibidores do FXa quer inibidores da trombina que têm proporcionado resultados clínicos impressionantes nos ensaios para a profilaxia de trombose venosa pós-operatória. Estes não requerem monitorização nem são afetados por interações com alimentos como os AVK; no entanto, têm as preocupações de segurança relacionadas com elevação das enzimas hepáticas e potenciais riscos de hemorragia associada com o seu uso prolongado. Nesta fase, são escassos os dados a longo prazo sobre o etexilato de dabigatran ou rivaroxabano. Os ensaios clínicos a decorrer por períodos mais longos de tratamento irão com certeza fornecer informações mais rigorosas sobre a potencial hepatotoxicidade⁴⁵. Portanto, é ainda cedo para se prever se os AVK serão substituídos pelos novos anticoagulantes orais⁴⁶. A falta de um inibidor específico para utilização quando é necessária a reversão urgente parece ser um problema mais teórico do que prático, devido ao tempo de semi-vida relativamente curto do etexilato de dabigatran e do rivaroxabano. Assim, apesar das previsões otimistas sobre a utilidade superior dos novos anticoagulantes orais emergentes, a sua utilização terapêutica está longe de ser a ideal⁴⁷. Há que considerar o elevado custo que implicam para o paciente e mesmo para o Sistema Nacional de Saúde se a todos os doentes medicados com varfarina fossem prescritos indiscriminadamente os NOAC.

Assim, a procura de novas alternativas para a terapêutica antitrombótica continua. A heparina parece continuar a desempenhar um papel central nas principais linhas de investigação que poderão fazer chegar, no futuro, à terapêutica anticoagulante, uma heparina totalmente sintética, uma heparina oralmente ativa, ou pequenas moléculas polissulfatadas que mimetizem as funções das heparinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.Lippi, G.; Favaloro, E. J.; Franchini, M.; Guidi, G. C. Milestones and Perspectives in Coagulation and Hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35: 9-22.
2.Lippi, G.; Franchini, M. Pathogenesis of

Venous Thromboembolism: When the Cup Runneth Over. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34: 747-761.

3.Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Pinto, M. Emerging sulfated small molecules as drugs: nature as an inspiration *Med Res Rev.* 2013; Doi: 10.1002/med.21282. [Epub ahead of print].

4.Moualla, H.; Garcia, D. Vitamin K Antagonists - Current Concepts and Challenges. *Thromb Res.* 2011; 128: 210-215.

5.Ansell, J.; Hirsh, J.; Hylek, E.; Jacobson, A.; Crowther, M.; Palareti, G. Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists. *Chest* 2008; 133: 160S-198S.

6.Palareti, G.; Cosmi, B. Bleeding with anticoagulation therapy - Who is at risk, and how best to identify such patients. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 268-278.

7.Linhardt, R. J. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: Structure and activity. *J Med Chem.* 2003; 46: 2551-2564.

8.Olson, S. T.; Swanson, R.; Raub-Segall, E.; Bedsted, J.; Sadri, M.; Petitou, M.; Herault, J. P.; Herbert, J. M.; Bjork, I. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems - Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost.* 2004; 92, 929-939.

9.Vanboeckel, C. A. A.; Petitou, M. The unique anti-thrombin-III binding domain of heparin - a lead to new synthetic antithrombotics. *Angewandte Chemie, International Edition in English* 1993, 32: 1671-1690.

10.Menajovsky, L. B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. *Am J Med.* 2005; 118: 21S-30S.

11.Carlson, M. K.; Gleason, P. P.; Sen, S. Elevation of hepatic transaminases after enoxaparin use: Case report and review of unfractionated and low-molecular-weight heparin-induced hepatotoxicity. *Pharmacotherapy* 2001; 21:108-113.

12.Reichel, C.; Benetka, E.; Geisendorfer, T.; Scheibelhofer, V.; Abzieher, F. The interference of heparin on IEF-PAGE of erythropoietins. *Drug Testing and Analysis* 2010; 2:568-575.

Agradecimentos - Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), PEst-OE/SAU/UI4040/2011, FEDER, POCI, POPH, FSE, QREN pelo financiamento e pela bolsa de pós-doutoramento a Marta Correia da Silva (SFRH/ BPD/81878/2011).

13. Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.; Viswanathan, K.; Bisio, A.; Capila, I.; Lansing, J. C.; Guglieri, S.; Fraser, B.; Al-Hakim, A.; Gunay, N. S.; Zhang, Z.; Robinson, L.; Buhse, L.; Nasr, M.; Woodcock, J.; Langer, R.; Venkataraman, G.; Linhardt, R. J.; Casu, B.; Torri, G.; Sasisekharan, R. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotech* 2008; 26: 669-675.
14. Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Shaughnessy, S. G.; Anand, S. S.; Halperin, J. L.; Raschke, R.; Granger, C.; Ohman, E. M.; Dalen, J. E. Heparin and low-molecular-weight heparin - Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 2001; 19: 64S-94S.
15. Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A. A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next? *Angewandte Chemie International Edition* 2004; 43: 3118-3133.
16. Turpie, A. G. The safety of fondaparinux for the prevention and treatment of venous thromboembolism. *Expert Opinion on Drug Safety* 2005; 4: 707-721.
17. Kuo, K. H. M.; Kovacs, M. J. Fondaparinux: A potential new therapy for HIT. *Hematology* 2005; 10: 271-275.
18. Bijsterveld, N. R.; Moons, A. H.; Boekholdt, S. M.; van Aken, B. E.; Fennema, H.; Peters, R. J. G.; Meijers, J. C. M.; Buller, H. R.; Levi, M. Ability of recombinant factor VIIa to reverse the anticoagulant effect of the penta-saccharide fondaparinux in healthy volunteers. *Circulation* 2002; 106: 2550-2554.
19. Turpie, A. G. G. Oral, direct Factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 220. Weitz, J. I. Factor Xa and thrombin as targets for new oral anticoagulants. *Thromb Haemost.* 2011; 127: S5-S12.
20. O'Brien, P. J.; Mureebe, L. Direct Thrombin Inhibitors. *J Cardiovas Pharmacol Therap.* 2011.
21. Antman, E. M. The search for replacements for unfractionated heparin. *Circulation* 2001; 103: 2310-2314.
22. Mohapatra, R.; Tran, M.; Gore, J. M.; Spencer, F. A. A review of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran: Not yet the end of the warfarin era... *Am Heart J.* 2005; 150: 19-26.
23. Agnelli, G.; Eriksson, B. I.; Cohen, A. T.; Bergqvist, D.; Dahl, O. E.; Lassen, M. R.; Mouret, P.; Rosencher, N.; Andersson, M.; Bylock, A.; Jensen, E.; Boberg, B. Safety assessment of new antithrombotic agents: Lessons from the EXTEND study on ximela-gatran. *Thromb Res.* 2009; 123: 488-497.
24. Eriksson, B. I.; Smith, H.; Yasothan, U.; Kirkpatrick, P. Dabigatran etexilate. *Nature Rev Drug Discovery* 2008; 7: 557-558.
25. Rupprecht, H.-J.; Blank, R. Clinical pharmacology of direct and indirect factor Xa inhibitors. *Drugs* 2010; 70: 2153-70.
26. Perzborn, E.; Roehrig, S.; Straub, A.; Kubitza, D.; Mueck, W.; Laux, V. Rivaroxaban: A New Oral Factor Xa Inhibitor. *Arter Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 376-381.
27. Abrams, P. J.; Emerson, C. R. Rivaroxaban: A Novel, Oral, Direct Factor Xa Inhibitor. *Pharmacotherapy* 2009; 29: 167-181.
28. Bristol-Myers Squibb. Eliquis (apixaban) approved in Europe for preventing venous thromboembolism after elective hip or knee replacement. http://www.bms.com/news/press_releases/pages/default.aspx (May 20, 2011).
29. Connolly, S. J.; Eikelboom, J.; Joyner, C.; Diener, H.-C.; Hart, R.; Golitsyn, S.; Flaker, G.; Avezum, A.; Hohnloser, S. H.; Diaz, R.; Talajic, M.; Zhu, J.; Pais, P.; Budaj, A.; Parkhomenko, A.; Jansky, P.; Commerford, P.; Tan, R. S.; Sim, K.-H.; Lewis, B. S.; Van Mieghem, W.; Lip, G. Y. H.; Kim, J. H.; Lanan-Zanetti, F.; Gonzalez-Hermosillo, A.; Dans, A. L.; Munawar, M.; O'Donnell, M.; Lawrence, J.; Lewis, G.; Afzal, R.; Yusuf, S. Apixaban in Patients with Atrial Fibrillation. *N Eng J Med.* 2011; 364: 806-817.
30. Weitz, J. I.; Hirsh, J.; Samama, M. M. New Anti-thrombotic Drugs. *Chest* 2008, 133, 234S-256S.
31. Johnson, E. O.; Konstandi, M.; Babis, G. C.; Piagkou, M.; Soucacos, P. N. The Plasma Coagulation Cascade: Potential Targets for Novel Anti-coagulants in Major Lower Limb Surgery. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011; 9: 3-10.
32. Eikelboom, J. W.; Weitz, J. I. New Anti-coagulants. *Circulation* 2010; 121: 1523-1532.
33. Ludwig, R. J. Therapeutic use of heparin beyond anticoagulation. *Curr Drug Discov Technol* 2009; 6: 281-9.
34. Codée, J. D. C.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; van Boeckel, C. A. A. The synthesis of well-defined heparin and heparan sulfate fragments. *Drug Discovery Today. Technologies* 2004; 1: 317-326.
35. Gandhi, N. S.; Mancera, R. L. Heparin/heparan sulphate-based drugs. *Drug Discovery Today* 2010; 15: 1058-69.
36. Avci, F. Y.; Karst, N. A.; Linhardt, R. J. Synthe-

- tic oligosaccharides as heparin-mimetics displaying anticoagulant properties. *Curr Pharmaceutical Design* 2003; 9: 2323-2335.
- 37.Paliwal, R.; Paliwal, S. R.; Agrawal, G. P.; Vyas, S. P. Recent advances in search of oral heparin therapeutics. *Med Res Rev.* 2011; 31: 1-22.
- 38.Rashid, Q.; Singh, P.; Abid, M.; Jairajpuri, M. Limitations of conventional anticoagulant therapy and the promises of non-heparin based conformational activators of anti-thrombin. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 34: 251-259.
- 39.Raju, T. N. K. The Nobel Chronicles. *The Lancet* 2000; 355: 583.
- 40.Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Duarte, B.; Marques, F.; Carvalho, F.; Cunha-Ribeiro, L. M.; Pinto, M. M. M. Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: a new class of anticoagulant agents. *J Med Chem.* 2011; 54: 95-106.
- 41.Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Duarte, B.; Marques, F.; Cunha-Ribeiro, L. M.; Pinto, M. M. M. Dual anticoagulant/antiplatelet persulfated small molecules. *Eur J Med Chem.* 2011; 46: 2347-2358.
- 42.Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Duarte, B.; Marques, F.; Carvalho, F.; Cunha-Ribeiro, L. M.; Pinto, M. M. M. Polysulfated Xanthenes: Multipathway Development of a New Generation of Dual Anticoagulant/Antiplatelet Agents. *J Med Chem.* 2011; 54: 5373-5384.
- 43.Eikelboom, J. W.; Quinlan, D. J.; O'Donnell, M. Major Bleeding, Mortality, and Efficacy of Fondaparinux in Venous Thromboembolism Prevention Trials. *Circulation* 2009; 120: 2006-2011.
- 44.Tsiara, S.; Pappas, K.; Boutsis, D.; Laffan, M. New Oral Anticoagulants: Should They Replace Heparins and Warfarin? *Hellenic J Cardiol.* 2011; 52: 52-67.
- 45.Bounameaux, H. The novel anticoagulants: entering a new era. *Swiss Med Weekly* 2009; 139: 60-64.
- 46.Fareed, J.; Hoppensteadt, D. A.; Fareed, D.; Demir, M.; Wahi, R.; Clarke, M.; Adiguzel, C.; Bick, R. Survival of heparins, oral anticoagulants, and aspirin after the year 2010. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34: 58-73.