



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

**EFEITO DA *Campomanesia xanthocarpa* NA AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA: COMPARAÇÃO E SINERGISMO COM O ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO, ESTUDO PILOTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JULIANA SOARES OTERO

CRUZ ALTA-RS, Brasil

2016

**EFEITO DA *Campomanesia xanthocarpa* NA AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA: COMPARAÇÃO E SINERGISMO COM O ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO, ESTUDO PILOTO**

Por

JULIANA SOARES OTERO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), em associação ampla à Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Atenção Integral à Saúde**

Orientador: Prof. Dr. JONATAS ZENI KLAFKE

Co-Orientador: Prof. Dr. PAULO RICARDO NAZÁRIO VIECILI

CRUZ ALTA -RS, Brasil

2016

**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE
REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO INIBITÓRIO DA *Campomanesia xanthocarpa* NA
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA: COMPARAÇÃO E SINERGISMO COM
O ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

elaborada por

JULIANA SOARES OTERO

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Atenção Integral à Saúde

Prof. Dr. JONATAS ZENI KLAFKE
(Orientador)

Prof. Dr. PAULO RICARDO NAZÁRIO VIECILI
(Co-Orientador)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. MIRNA STELA LUDWING - UNIJUÍ

Prof. Dr. MATIAS NUNES FRIZZO - UNIJUÍ

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO MAYORA AITA - PUCRS

CRUZ ALTA, 02 de dezembro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado ao meu esposo Cristiano, meus pais Mário e Leda, e meus irmãos João Cláudio e Paulo André, pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento vai para aqueles que acreditaram que eu era capaz, quando nem eu mesmo mais acreditava; vai para aqueles que, mesmo com minha crise de histeria, estiveram do meu lado me dizendo que tudo ficaria bem; vai para aqueles que souberam me entender quando eu não estava de bom humor.

Meu agradecimento vai para meus familiares e amigos que sempre estiveram comigo leais, fiéis e solidários; vai para aqueles que se fizeram presentes nesse momento de angústia sufocante e vai também para aqueles que me deram as costas quando eu mais precisei deles, pois embora estivesse sozinha aprendi que nem tudo na vida são flores.

Meu agradecimento, em especial, vai para meu marido Cristiano Rafael Kuntz Almeida, para meus pais Mário e Leda Otero, irmãos João Cláudio e Paulo André Otero e demais familiares que sempre estiveram do meu lado, principalmente, nos momentos de adversidade.

Meu agradecimento vai para o meu orientador, mestre e amigo professor Dr. Jônatas Zeni Klafke e meu co-orientador professor doutor Paulo Ricardo Nazário Viecili que me proporcionaram a elaboração desta Dissertação de Mestrado, bem como conduziram com maestria sua confecção, e aos colegas do Grupo Multidisciplinar em Saúde (GMS), por todo e cada subsídio que contribuíram e possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, colegas e professores, à Universidade de Cruz Alta e à Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, que me permitiram ampliar meu conhecimento nas mais diversas áreas.

A todos vocês, do fundo do meu coração, o meu muito obrigado!

"A diferença entre o impossível e o possível está na determinação de uma pessoa".

Tommy Lasorda

EFEITO INIBITÓRIO DA *Campomanesia xanthocarpa* NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA: COMPARAÇÃO E SINERGISMO COM O ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

RESUMO

As folhas da planta *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (*Myrtaceae*), popularmente conhecida como "guavirova", presente na região Sul do Brasil são usadas empiricamente, como infusão, na medicina popular para tratar doenças inflamatórias e hipercolesterolemia, criando assim um vasto campo de oportunidades para estudos e investigações. Neste sentido, tomando a planta como uma das linhas de investigação do nosso grupo de pesquisa. Verificou-se *Campomanesia xanthocarpa* possui intensa quantidade de saponinas, que tem muitas atividades biológicas, entre elas, uma possível atividade antiplaquetária. Então foi realizado um estudo direcionado a avaliar um possível efeito na atividade plaquetária, no sentido de melhor entender esse fenômeno com a *C. xanthocarpa*, onde encontramos atividades antiplaquetária, antitrombótica e fibrinolítica em camundongos. Assim, devido a importância deste novo campo de estudo que a *C. Xanthocarpa* vem apresentando, somado aos resultados na inibição plaquetária em modelo animal, descrito acima, quando comparada com o ácido acetilsalicílico (AAS), e baseado na necessidade de se estudar a viabilidade de novos compostos terapêuticos, o presente estudo objetiva investigar os efeitos da *C. xanthocarpa* na função plaquetária de humanos, para melhor compreender o efeito dessa planta e aprofundar ainda mais os estudos e investigações que alicerçam essa linha de pesquisa, estimulando uma possível terapêutica alternativa e inovadora. Trata-se de um estudo clínico, randomizado, duplo cego, com placebo versus dupla intervenção. A população foi constituída por 30 indivíduos hígidos entre 18 e 50 anos que aceitem participar do estudo. Então os indivíduos foram aleatoriamente divididos em três grupos: (1) grupo AAS, o qual recebeu 100 mg de AAS (2) grupo *C. xanthocarpa*, o qual recebeu 1000 mg de *C. xanthocarpa*, (3) grupo *C. xanthocarpa* + AAS, o qual recebeu 500 mg de *C. xanthocarpa* juntamente com 50 mg de AAS, diariamente por cinco dias. Foram realizadas coletas sanguíneas antes do tratamento, para fins de controle, no sexto dia de tratamento, para verificação da atividade inibitória máxima. Além disso, foram realizadas duas coletas adicionais, no segundo e oitavo dias após o tratamento, para a análise da recuperação da função plaquetária. Em seguida, foram realizadas as análises de agregação plaquetária através de método turbidimétrico para fins de monitorização da função plaquetária encontrada em cada coleta de sangue, verificando o efeito dos tratamentos utilizados. Os Resultados evidenciaram que o tratamento com *C. xanthocarpa* e a associação sinérgica entre a *C. xanthocarpa* e o AAS causaram uma redução de $8 \pm 13,5\%$ e $12,5 \pm 5\%$ da agregação plaquetária induzida por ADP, após 5 dias de tratamento, respectivamente, retornando aos níveis basais após 8 dias. Para o agonista de AA, 5 dias de tratamento com *C. xanthocarpa*, AAS ou sinérgico causaram uma redução de $46 \pm 15\%$, $36 \pm 12\%$ e $69,3 \pm 6\%$ na agregação de plaquetas, respectivamente, e os dois primeiros grupos voltaram aos valores de linha de base 8 dias após o final do tratamento. Contudo o grupo Sinérgico apresentou efeito antiplaquetário prolongado mantendo a redução da agregação após 8 dias no final do tratamento. Concluímos que a *C. xanthocarpa* demonstra ação antiplaquetária quando estimulado pelo agonista AA, e contribui para

o efeito antiplaquetário quando associado a ASA para ambos os agonistas, permitindo a redução da dose de AAS para de 50 mg.

Palavras-chave: adenosina difosfato, ácido araquidônico, *C. xanthocarpa*, plantas medicinais, agregação plaquetária

INHIBITORY EFFECT OF *Campomanesia xanthocarpa* IN PLATELET AGGREGATION: COMPARISON AND SYNERGISM with acetylsalicylic acid

ABSTRACT

The leaves of the plant *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularly known as "guavirova", present in southern Brazil are used empirically, as an infusion, in folk medicine to treat inflammatory disease and hypercholesterolemia, thus creating a vast field of opportunities for study and research. In this sense, taking the plant as one of the lines of research of our research group. It was found *Campomanesia xanthocarpa* has intense amount of saponins, which has many biological activities, among them, a possible antiplatelet activity. So, we conducted a study aimed to evaluate a possible effect on platelet activity, in order to better understand this phenomenon with *C. xanthocarpa* where we find antiplatelet activity, antithrombotic and fibrinolytic in mice. Thus, because of the importance of this new field of study that has shown *C. xanthocarpa*, added to the results in platelet inhibition in an animal model described above, compared with acetylsalicylic acid (ASA), and based on the need to study the feasibility of new therapeutic compounds, the present study aims to investigate the effects of *C. xanthocarpa* on platelet function in humans to better understand the effect of this plant and further deepen the studies and research that underpin this line of research, stimulating a possible alternative therapy and innovative. This is a clinical, randomized, double-blind, placebo versus double intervention. The population consisted of 30 healthy individuals between 18 and 50 years to accept the study. Then the subjects were randomly divided into three groups: (1) ASA group, which received 100 mg of aspirin (2) *C. xanthocarpa* group, which received 1,000 mg *C. xanthocarpa*, (3) group *C. xanthocarpa* + ASA, which received 500 mg *xanthocarpa* C. together with 50 mg of aspirin daily for five days. Blood samples were taken before treatment, for control purposes, on the sixth day of treatment, for verification of the maximum inhibitory activity. Furthermore, there were two additional samplings, the second and eighth day after treatment, to analyze the recovery of platelet function. Then, we analyze platelet aggregation by turbidimetric method for the purpose of monitoring the platelet function found in each blood collection were performed to verify the effect of the treatments used. The results showed that treatment with *C. xanthocarpa* and synergistic association between *C. xanthocarpa* and ASA caused a reduction of $8\% \pm 13.5$ and $12.5 \pm 5\%$ of platelet aggregation induced by ADP, after 5 days of treatment respectively, returning to baseline levels after 8 days. For the agonist AA, 5 days treatment with *C. xanthocarpa*, ASA or synergism caused a reduction of $46 \pm 15\%$ $36 \pm 12\%$ and $\pm 6 69.3\%$ in platelet aggregation, respectively, and the first two groups they returned to baseline values 8 days after the end of treatment. However synergism group showed prolonged antiplatelet effect keeping the reduction of aggregation after 8 days at the end of treatment. We concluded that *C. xanthocarpa* shows antiplatelet action when stimulated by agonist AA, and contributes to the antiplatelet effect when combined with ASA for both agonists, allowing reduction of ASA dose of 50 mg.

Keywords: adenosine diphosphate; arachidonic acid; *C. xanthocarpa*; medicinal plants; platelets aggregation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto ilustrativa do papel central das plaquetas na gênese da trombose.....**22**
- Figura 2.** Foto ilustrativa das folhas e do fruto de *Campomanesia xanthocarpa***33**

LISTA DE ABREVIATURAS

15R-HETE: ácido 15R-hidroxiieicosatetraenoico;
5-HPETE: ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico;
AA: ácido araquidônico;
AAS: ácido acetilsalicílico;
ADP: difosfato de adenosina;
AVE: acidente vascular encefálico;
cAMP: monofosfato cíclico de adenosina;
CMLV: célula muscular lisa vascular;
COX: ciclooxigenase;
DAC: doença arterial coronariana;
DCVs: doenças cardiovasculares;
eNOS: óxido-nítrico-sintase-endotelial;
FRs: fatores de risco;
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina;
GP: glicoproteína;
IAM: infarto agudo do miocárdio;
IFN- γ : interferon gama;
IL: interleucina;
IL-1: interleucinas 1;
LDL: lipoproteínas de baixa densidade;
L-NAME: NG-metil-L-arginina éster de etilo;
LOX: lipoxigenases;
LTA₄: leucotrieno A₄;
LTB₄: leucotrieno B₄;
LTs: leucotrienos;
NF κ B: fator nuclear kappa B;
NO: óxido nítrico;
OMS: Organização Mundial da Saúde;
PGH₂: prostaglandina 2;
PGI₂: prostaciclina 2;
PGs: prostaglandinas;
PIs: prostaciclina ;
PLA₂: fosfolipase A₂;
TNF α : fator de necrose tumoral-alfa;
TXA₂: tromboxano A₂;
vWF: fator de von Willebrand.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE IGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	18
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Hemostasia e agregação plaquetária	21
3.2 Plaquetas e vias de agregação plaquetária	23
3.2.1 Via do Ácido Araquidônico (AA).....	23
3.2.1.1 Via da Cicloxigenases	24
3.2.1.2 Via das Lipoxigenases	25
3.2.2 Via da Adenosina Difosfato (ADP)	25
3.2.3 Interface NO e agregação plaquetária	26
3.3 Terapia antitrombótica convencional com aas.....	27
3.4 Terapia antitrombótica alternativa com produtos naturais.....	29
3.5 <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	29
4.1 ARTIGO 1: Inhibitory effect of <i>Campomanesia xanthocarpa</i> in platelet aggregation: comparison and synergism with acetylsalicylic acid	34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8 ANEXOS	81

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de uma breve introdução a respeito do tema abordado, que posteriormente é reiterado com uma revisão bibliográfica.

Em seguida são relatados os objetivos deste trabalho.

Os itens materiais e métodos, resultados, discussões e conclusão, que fazem parte desta dissertação, estão apresentados na forma de artigo, sendo que o mesmo se encontra estruturado de acordo com as normas da revista científica ***Trombosis Research*** na qual foi submetido para apreciação de publicação em novembro de 2016.

Para finalizar, as considerações finais estão dispostas, e as referências bibliográficas constadas no final desta dissertação, referem-se aos itens introdução e revisão bibliográfica anteriormente abordados.

Ainda a presente dissertação visa contribuir com a produção científica na área de etnofarmacologia, esclarecendo as atividades químicas e biológicas da *Campomanesia xanthocarpa* no aspecto antiagregante plaquetário. Permitir a atualização do profissional médico acerca dos produtos naturais no tratamento alternativo e complementar antiagregante plaquetário. Bem como gerar produto técnico-científico com a produção e publicação de artigo de revisão e defesa de dissertação de mestrado.

1 INTRODUÇÃO

A noção de que plaquetas funcionais são de extrema importância para o sucesso dos processos imunes e hematológicos, nos revela seu papel de destaque na gênese de patologias tromboembólicas. As células efetoras da hemostasia e altamente especializadas, em resposta aos sinais de ativação, tem seu fenótipo quiescente transformado para uma célula efetora e versátil, participando de processos adicionais e amplificando a resposta inflamatória durante a trombose presente na disfunção endotelial (DE), principal fator de risco (FR) para doenças cardiovasculares (DCVs), que se caracteriza por uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), afetando diretamente a vasodilatação dependente de endotélio (FAVERO *et al.*, 2014).

O próprio mecanismo de ativação plaquetária libera substâncias ativas importantes na redução do fluxo sanguíneo no que se refere à lesão vascular. Com a formação do trombo, haverá um estreitamento da artéria que causará um aumento na velocidade do sangue naquela região, gerando um fluxo turbulento. Este bloqueio poderá fechar a provisão de sangue à parte afetada; e caso isso ocorra, aumentam os riscos de desfechos como acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM) e morte em pacientes portadores de DCVs (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A DCV, em especial as de origem trombóticas ocasionadas pela aterosclerose, é a principal causa de mortalidade no Brasil (DATA SUS, 2014). De fato, a Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que em 2015 aproximadamente 30% da mortalidade mundial foram atribuídas às DCVs, tendo como principal base patológica a aterosclerose (COUNTRIES; FUSTER; KELLY, 2010), representando cerca de 40% de toda a mortalidade nas sociedades ocidentais (SOEHNLEIN, 2015). Além disso, há uma estimativa de que até 2030, mais de 23,3 milhões de pessoas venham a óbito anualmente por DCVs (LOZANO, 2012).

Essa doença é multifatorial e a compreensão de como ocorre seu desenvolvimento tem evoluído sistematicamente (BAHIA, 2006). Estudo demonstrou que fatores de risco (FRs) para DCVs (como dislipidemia, diabetes, hipertensão, sedentarismo, entre outros) atuam diretamente sobre o endotélio vascular (BADIMON; VILAHUR, 2014), causando DE, que conduz para alterações funcionais e fenotípicas do vaso, facilitando a inflamação, a trombose, a vasoconstrição e, por fim, a aterosclerose (SILVA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, dos agentes antiagregantes, o ácido acetilsalicílico (AAS) é o mais empregado e conseqüentemente o mais bem conhecido de sua classe, sendo reconhecidamente indicado para a prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares, bem como para prevenir complicações da doença aterosclerótica cardiovascular (DAC) (CLARKE *et al.*, 1991; CYRUS, 2002; HENNEKENS, 2002).

Seu principal mecanismo de ação é a inibição irreversível da atividade das isoenzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e -2 (COX-2) (PATRONO, 2005). Essas, por sua vez, catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) (PATRONO *et al.*, 2005; VAN LAMMEREN *et al.*, 2011) em prostaglandina 2 (PGH₂), ocorrendo bloqueio da produção de tromboxano A₂. Outra forma de inibição decorre da acetilação da molécula da serina (posição 529 na COX-1 e 516 na COX-2), modificando o seu sítio ativo e, assim, permitindo a conversão de AA em ácido 15R-hidroieicosatetraenoico (15R-HETE), que conseqüentemente é convertida em 15-epi-LXA₄ pela 5-LOX, em células endoteliais vasculares (SPITE e SERHAN, 2010). Este intermediário é então transformado em lipoxinas pelos leucócitos, as quais possuem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (CHIANG *et al.*, 2004; CHIANG *et al.*, 2006).

O uso de baixas doses de AAS (81 mg (dose plasmática diária), recomendado pela American Heart Association inibe preferencialmente o TXA₂, um vasoconstritor derivado de plaquetas, ao invés da prostaciclina 2 (PGI₂) derivada do endotélio (CLARKE *et al.*, 1991). Este efeito diferencial demonstra vantagens, uma vez que a produção de PGI₂ preservada promove as propriedades antitrombóticas e antiinflamatórias do endotélio (KUMMER *et al.*, 2002).

A despeito da facilidade posológica do AAS para aderência terapêutica, ainda há grande parte da população que não tem acesso ao atendimento primário em saúde e por isso não realiza o tratamento medicamentoso adequado à terapia antiagregante plaquetária, o que é de suma importância tendo em vista o aumento do risco cardiovascular que este fato representa (DATA SUS, 2014). Além disso, esta droga pode produzir efeitos adversos como eventos hemorrágicos (JOHNSON, 2008).

Estudos preliminares realizados em indivíduos saudáveis mostraram que a administração do AAS em doses baixas, à curto prazo, pode induzir inflamação leve da mucosa do intestino delgado, todavia, seu uso crônico resulta numa variedade de lesões no intestino delgado que incluem múltiplas petéquias, perda de vilosidades, erosões, úlceras redondas, irregulares ou extravasadas (JOHNSON, 2008).

Uma grande variedade de fitoquímicos ativos em plantas foram identificados, incluindo flavonóides, carotenóides, curcuminas, esteróis vegetais, lignanas, terpenóides, sulfetos, polifenóis, saponinas e cumarinas (CRAIG, 1999). A fitoterapia ocidental moderna cada vez mais enfatiza os efeitos das ervas em todo sistema corporal (MCEWEN, 2015). Dessa forma, vários estudos buscam novos compostos naturais para suprimir a agregação plaquetária sem causar efeitos adversos graves (LAU *et al.*, 2009; RYU *et al.*, 2009). Como consequência, diferentes estudos com plantas têm demonstrado efeitos positivos contra aterosclerose e aterosclerose, destacando-se estudos experimentais realizados *in vivo* e *in vitro*, (KLAFKE *et al.*, 2015; VIECILI *et al.*, 2014; KLAFKE *et al.*, 2012; KLAFKE *et al.*, 2010; PAPOUTSI *et al.*, 2008; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; WANG; NG, 1999).

Uma dessas plantas é a planta comestível *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecida como “guavirova”, presente na região sul do Brasil, e também encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai, a qual tem demonstrado possuir um vasto espectro de efeitos fisiológicos (LORENZI, 1992). As observações populares sobre o uso da *C. xanthocarpa* e a eficácia desta planta medicinal contribuirão de forma relevante para a divulgação de suas virtudes terapêuticas, apesar de não ter seus mecanismos bioquímicos ainda bem esclarecidos, sendo objeto de pesquisa de nosso grupo.

Em virtude da importância clínica e financeira das doenças trombogênicas circulatórias, torna-se cada vez mais importante o conhecimento do mecanismo plaquetário envolvido na fisiopatologia das doenças ateroscleróticas, além da busca de terapêuticas alternativas que possam atenuar as lesões decorrentes dessas injúrias, bem como minimizar custos e efeitos colaterais dos tratamentos preconizados como “padrão ouro” para esta moléstia, modulando e reduzindo a morbimortalidade em questão. Neste particular, apesar de estudos pré-clínicos já terem sido realizados na área, aspectos importantes referentes ao uso etnofarmacológico da *C. xanthocarpa* necessitam ainda ser melhor investigados, como sua atividade antiagregante plaquetária, previamente demonstrada *in vitro* e em modelo animal (KLAFKE *et al.*, 2012), justificando assim nosso estudo.

Sendo assim, levando em consideração que a planta atuou como um anti-inflamatório semelhante a ação do ácido acetilsalicílico, demonstrando efeito anti-agregante plaquetário (KLAFKE *et al.*, 2012) e anti-inflamatório (KLAFKE *et al.*, 2015); e semelhante a ação de uma estatina, demonstrando efeito hipolipemiante e antioxidante (KLAFKE *et al.*, 2010) em estudos prévios, abre-se oportunidade para um novo campo de estudo utilizando a *C. xanthocarpa*.

O objetivo desse estudo foi verificar se o extrato da planta *C. xanthocarpa* era capaz de alterar a função plaquetária, em indivíduos previamente hígidos e sem fatores de risco para DCVs, bem como comparar seus possíveis resultados antiagregantes plaquetários aos resultados da droga padrão AAS. Ainda objetivou-se a verificação do possível potencial sinérgico com o referido medicamento para melhor compreender o efeito dessa planta e aprofundar ainda mais os estudos e investigações que alicerçam essa linha de pesquisa, estimulando uma possível terapêutica alternativa e inovadora

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da *Campomanesia xanthocarpa* na agregação plaquetária, de indivíduos hígidos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se o pó encapsulado das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* reduz a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP e AA assim como o AAS após o tratamento de cinco (5) dias em indivíduos hígidos.

- Verificar se a associação entre o pó encapsulado das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* e o AAS apresenta efeito sinérgico na redução da agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP e AA assim como o AAS após o tratamento de 5 dias em indivíduos hígidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HEMOSTASIA E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A interação do endotélio vascular com a agregação plaquetária é complexa e envolve por vezes mecanismos antagônicos. No entanto, é justamente esta complexidade de efeitos pró-coagulantes e antiagregantes que mantém o controle eficaz da hemostasia primária realizada pelas plaquetas (SHAPIRO, 2003).

A hemostasia é um mecanismo fisiológico comum a todos os vertebrados que garante o equilíbrio dinâmico da forma fluida do sangue. Quando há integridade dos vasos sanguíneos e equilíbrio dos fatores de coagulação, o sangue flui normalmente (ROSEMBERG, 2001). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio nos fatores sanguíneos ou uma lesão em um vaso, o sistema hemostático é ativado e desencadeia uma série de reações que vão levar a formação de um coágulo ou trombo, evitando o extravasamento de sangue. Para tanto, para garantir o equilíbrio da fluidez do sangue, a hemostasia envolve dois processos complementares: a formação do coágulo sanguíneo e a sua posterior dissolução (GENTRY, 2003). Caso este processo não seja revertido adequadamente ou se acontecer de forma patológica, podem ocorrer distúrbios vasculares hemorrágicos ou trombóticos (AUSTIN, 2009).

O processo hemostático pode ser dividido em quatro fases, as quais de certa forma se relacionam: (1) a fase vascular, na qual ocorre constrição do vaso lesionado a fim de reduzir o fluxo sanguíneo no local; (2) a fase plaquetária (hemostasia primária), que leva a formação de um agregado de plaquetas no local da injúria; (3) a fase das proteínas ou fatores de coagulação sanguínea (hemostasia secundária), na qual ocorre, através de uma série de reações enzimáticas, a formação do coágulo de fibrina; e (4) a fase da fibrinólise, com dissolução completa ou parcial do coágulo sanguíneo (ALLFORD & MACHIN, 2004).

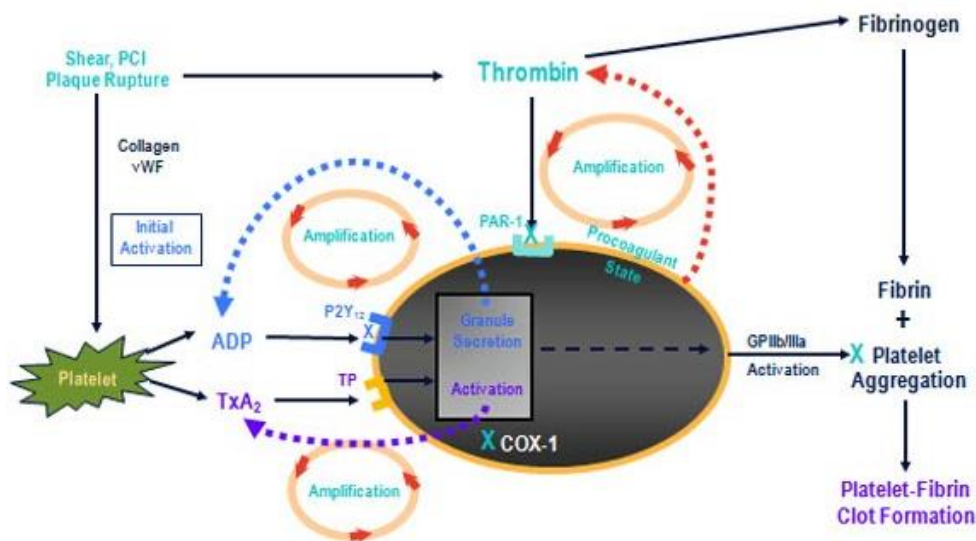
Quando ocorre uma lesão em um vaso sanguíneo, proteínas da matriz subendotelial como colágeno, laminina, fibronectina e trombospondina são expostas e ativam as plaquetas (células anucleadas derivadas de megacariócitos da medula óssea) e os fatores de coagulação, iniciando assim o processo da hemostasia, que vai culminar com a formação do coágulo e a interrupção da perda de sangue no local da lesão (ALMEIDA, 2001) (figura 1). Por outro lado, as plaquetas, quando ativadas, estão também envolvidas na progressão patológica de trombose vascular arterial, desempenhando um papel crucial na etiologia e complicações de várias patologias, entre elas doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (ALEXANDRU *et al*, 2012; SHARMA E BERGER, 2011; YOUSUF E BHATT, 2011; STEGNER E NIESWANDT, 2011). Após a ruptura da placa aterosclerótica, as plaquetas aderem aos tecidos conectivos subendoteliais expostos, causando sua ativação. Esta ativação é realizada pela ligação do fibrinogênio à glicoproteína (GP) IIb/IIIa (integrina $\alpha IIb/\beta 3$). O complexo do receptor IIb/IIIa, também é um sítio secundário de ligação com von Willebrand

(vWF); as microfibrilas subendoteliais ligam-se ao fator vWF, o qual se liga ao complexo Ib da membrana da plaqueta (SIMOONS, 2001). Desta forma, os complexos de receptores IIb/IIIa enquanto provomovem ativação plaquetária direta, concomitantemente promove maior adesão plaquetária via fator vWF (LEE *et al.*, 2006). Após essa ativação, as plaquetas movimentam-se ao longo da superfície dos vasos, através da formação de pseudópodes aumentando a interação entre as plaquetas adjacentes, até que a glicoproteína GPIa/IIa (GPIa/IIa), outra proteína de membrana plaquetária, reaja com o colágeno, fazendo com que ocorra amplificação da adesão plaquetária (LEE *et al.*, 2006; SIMOONS, 2001).

Depois da agregação das plaquetas, o fosfolípido exposto na membrana (fator plaquetário 3), fica disponível para duas reações da cascata de coagulação. A primeira envolve os fatores IXa, VIIIa e X na formação do fator Xa. A segunda resulta na formação de trombina a partir da interação dos fatores Xa., Va e protrombina (fator II). Desse modo ocorre a coagulação sanguínea, proporcionando a formação do coágulo intravascular, favorecendo a vasoconstrição, aumentando a capacidade pró-coagulante do endotélio e estimulando a inflamação local (GAILANI ET AL, 2010).

A exposição ao colágeno e a ação da trombina, resultam na secreção do conteúdo dos grânulos das plaquetas, incluindo ADP, serotonina, fibrinogênio, enzimas lisossômicas, β -tromboglobulina e fator de neutralização de heparina (fator plaquetária 4). As plaquetas também sintetizam prostaglandinas e Tromboxano A2 que potencializam a agregação de plaquetas no local da lesão vascular e têm intensa atividade vasoconstritora (FREEDMAN, 2005).

Figura 1. Foto ilustrativa do papel central das plaquetas na gênese da trombose.



Fonte: Adaptado de Grubel PA, *et al.*, 2005

3.2 PLAQUETAS E VIAS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A participação das plaquetas na hemostasia e trombose têm sido amplamente investigadas nas últimas décadas (OLIVEIRA *et al*, 2013). As pesquisas tradicionais nesta área utilizam técnicas comuns para o estudo de processos bioquímicos, celulares e moleculares plaquetários, e vêm ampliando o conhecimento sobre os elementos e os sinais que regulam suas funções, bem como colaboram para a compreensão do complexo papel das plaquetas na formação de trombos fisiológicos e patológicos, através da ativação, adesão e agregação (FURIE, 2008).

Fisiologicamente as plaquetas estão envolvidas no processo dinâmico da fase inicial da hemostasia, que necessita de uma série coordenada de eventos que envolvem receptores de membrana, sinais bidirecionais intracelulares com liberação de proteínas e de fatores inflamatórios (SAMPLE *et al*, 2011; GAY *et al*, 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo*, principalmente em modelos animais, sobre as funções dos receptores de superfície plaquetária, incluindo a inibição farmacológica por antagonistas específicos, tem ajudado a revelar novos mecanismos de como a propensão trombótica e hemorrágica das plaquetas é controlada em processos fisiopatológicos (RIVERA, 2009).

Sabe-se que uma grande variedade de receptores transmembranares cobre a membrana das plaquetas e, neste cenário, está cada vez mais reconhecido que os principais receptores plaquetários têm um papel proeminente na função hemostática, permitindo interações específicas e funcionais com proteínas adesivas vasculares e com seus agonistas solúveis (GAY, 2011). Dessa forma, vários agonistas podem induzir a agregação de plaquetas, dentre eles, por exemplo, o difosfato de adenosina (ADP) e ácido araquidônico (AA).

3.2.1 Via do Ácido Araquidônico (AA)

O ácido araquidônico (AA) apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. Consiste em um ácido o qual, normalmente, é esterificado na membrana fosfolipídica e sua liberação ocorre pela ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) (Murakami e Kudo, 2003), a qual, pode ser ativada por diversos estímulos como: químicos, inflamatórios, traumáticos (shear stress) e mitogênicos, que também ativam citocinas pró-inflamatórias como interleucinas 1 (IL-1) (BROOKS *et al.*, 1999).

Posteriormente, o AA é então metabolizado por 2 vias: I) a catalização da cicloxigenases (COX), que gera produtos, incluindo prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PIs) e tromboxanos (TXs), e II) e a catalização das lipoxigenases (LOX), que levam a síntese de leucotrienos (LTs) e lipoxinas. (GILMAN *etal.*, 2006; RANG *et al.*, 2007; YEDGAR *etal.*, 2007). PGs, PIs, TXs e LTs são responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, que podem apresentar atividade pró-inflamatórias ou ainda pró-trombótica (YEDGAR *et al*, 2007; KATZUNG, 2006).

Nas plaquetas, o AA, gerado a partir dos fosfolipídios de membrana, tem acesso ao sítio catalítico da cicloxigenase plaquetária (COX-1), permitindo a formação de endoperóxidos, o que implica a formação dos produtos finais da metabolização do AA, em especial, as prostaglandinas (PGG₂). A PGG₂, por sua vez, é catalisada a TXA₂ pela tromboxano sintetase, promovendo agregação plaquetária (CASTRO *et al*, 2006).

3.2.1.1 Via da Cicloxigenases

A enzima cicloxigenase tem papel importante na produção de PGs, uma classe de composto com ações fisiológicas importantes dentre outros exercendo papel central na inflamação, na angiogênese, no tônus vascular, nas respostas imunes e na coagulação sanguínea (KUMMER & COELHO, 2002; KVATERNICK *et al.*, 2007). O AA é convertido pela enzima cicloxigenase (COX) nos compostos intermediários endoperóxidos cíclicos PGG₂ e PGH₂ (DRIEDRICH *et al*, 1990). A COX apresenta dois sítios catalíticos: o sítio cicloxigenase e o sítio peroxidase. O sítio cicloxigenase promove a oxidação do AA em PGG₂, que por sua vez é reduzida ao intermediário instável PGH₂ pelo sítio peroxidase (BROOKS *et al.*, 1999). A PGH₂ é convertida pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides (HILÁRIO *et al.*, 2006; FILHO & RAHAL, 2008, KING *et al.*, 2009), dependentemente do tipo de isomerase presente em cada tecido, por exemplo, as plaquetas sanguíneas que produzem TXA₂ e PGD₂ (MARNETT *et al.*, 2009).

Existem duas isoformas de enzima cicloxigenase: a COX I e a COX II, que determinam no organismo diferentes funções fisiológicas (HILÁRIO, *et al.*, 2006, MARNETT *et al.*, 2009). A COX I está presente em quase todos os tipos de células, com exceção do eritrócito, sendo chamada de constitutiva, levando a formação de PGs, principalmente, relacionadas com ações fisiológicas como, proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Nas plaquetas, a COX I está associada à síntese do tromboxano A₂ (principal agente agregante e vasoconstritor (LUO, 2016), mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária. Portanto, sua inibição está associada ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (FRANCO *et al.*, 2006; BRICKS & SILVA, 2005; LEES *et al.*, 2004; KUMMER & COELHO, 2002).

Como relatado anteriormente, a agregação de plaquetas é mediada através das sínteses de prostaglandina G₂ e H₂ e tromboxano A₂ (TXA₂), devido à ação catalítica da cicloxigenase (COX) sobre AA, libertado a partir da membrana de plaquetas, devido às ações agonísticas de agentes de agregação (HAMBERG *et al.*, 1974). Sabe-se que a inibição da COX, por agente antagonistas, resulta normalmente na redução da agregação de plaquetas sem afetar a síntese de AMP cíclico. Porém, novos estudos tem relatado que essa capacidade antiagregante não se dá somente

pela inibição da COX, mas também através da síntese celular de NO (CHAKRABORTY *et al.*, 2003), o qual será discutido adiante.

3.2.1.2 Via das Lipoxigenases

As lipoxigenases, presentes principalmente no citosol, são encontradas nos pulmões, leucócitos, mastócitos e plaquetas. A principal enzima do grupo é a 5-lipoxigenase, que atua sobre o ácido araquidônico produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄). Posteriormente, o LTA₄ pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (GOODMAN *et al.*, 2009),

O LTB₄, importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN *et al.*, 2009).

Importante salientar que, conforme Spite e Serhan (2010), alguns fármacos apresentam a capacidade de causar a acetilação da COX-2, modificando o seu sítio ativo e, assim, permitindo a conversão de ácido araquidônico em ácido 15R-hidroieicosatetraenoico (15R-HETE) em células endoteliais vasculares. Este intermediário é então transformado em lipoxinas pelos leucócitos (CHIANG *et al.*, 2004; CHIANG *et al.*, 2006). Como exemplo, pode-se citar a formação de 15-epi-lipoxina, a qual está presente em indivíduos saudáveis que tomam AAS em baixas doses, mostrando-se independente da idade e do gênero (CHIANG *et al.*, 2004; CHIANG *et al.*, 2006).

3.2.2 Via da Adenosina Difosfato (ADP)

A adenosina-5'-difosfato (ADP), descrito como um dos mais importantes agonistas plaquetários, desempenha um papel crucial na ativação e agregação de plaquetas (BURNSTOCK, 2011). Contudo, o ADP é considerado um agonista plaquetário fraco, uma vez que induz alterações morfológicas nas plaquetas (uma fase precoce de ativação plaquetária) e agregação ainda reversível (CATTANEO *et al.*, 2005). No entanto, além de induzir a agregação plaquetária primária, quando o ADP é secretado de seus *pools* de armazenamento, em grânulos densos de plaquetas ativadas, pode resultar em agregação plaquetária secundária, amplificando e propagando as respostas de plaquetas induzidas por outros agonistas plaquetários (HECHLER *et al.*, 2005; ROZALSKI *et al.*, 2005).

Sabe-se que a ADP medeia a agregação de plaquetas através da estimulação de dois receptores, subclasse dos receptores P₂Y, acoplados a proteína G, P₂Y₁ e P₂Y₁₂. (OFFERMANN, 2006; STOREY *et al.* 2000). O receptor purinérgico P₂Y₁, possuem preferência por ADP e quando ativado sinaliza, através

da ativação da proteína G da fosfolipase C, a mobilização intracelular de cálcio gerando incremento transitório no Ca^{2+} citoplasmático. Os receptores purinérgicos P2Y₁₂ são acoplados a subunidades alfa G_i-G_o de proteínas de ligação do GTP. Os receptores P2Y₁₂ são encontrados nas plaquetas, onde desempenham papel importante na ativação plaquetária através da inibição da adenil ciclase e amplificação a resposta de agregação.

Estimulantes do receptor P2Y₁₂ podem inibir a adenil ciclase, reduzindo o teor de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), levando a um posterior incremento adicional de Ca^{2+} intra-plaquetário. Elevar o nível de Ca^{2+} é a única via para induzir e manter a agregação de plaquetas via glicoproteína (GP IIb-IIIa) (CATTANEO *et al*, 2005). Além disso, a distribuição limitada do receptor P2Y₁₂, expresso principalmente nas plaquetas, torna-o um alvo farmacológico especialmente atrativo para fármacos anti-trombóticos (BARN *et al*, 2012).

Sabe-se, portanto, que a inibição uma das vias de sinalização desses receptores purinogênicos pode reduzir a ativação e agregação de plaquetas mediada por ADP (OLIVEIRA, 2013).

3.2.3 Interface NO e agregação plaquetária

Nos últimos anos, o endotélio vascular vem ganhando atenção nos estudos da fisiologia circulatória (LUO *et al*, 2016). Sua função e estrutura são muito discutidas na clínica, sendo também temas muito pesquisados em níveis laboratoriais, principalmente no que tange aos aspectos de modulação do tônus vascular e seu potencial anti-trombogênico (GERDES, 2016).

Em condições fisiológicas, por ser considerado um órgão endócrino ativo, o endotélio, por promover alterações funcionais adaptativas, contribui com a homeostase vascular (FELIZZOLA, 1996). Através de estímulo como a força de arraste e a tensão de cisalhamento (shear stress) exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, especialmente durante a atividade física há a formação de óxido nítrico (NO), mantendo o vaso em um estado constante de vasodilatação. Este mecanismo, além de conferir ao endotélio o papel de protetor do vaso sanguíneo, é o principal mecanismo fisiológico de liberação do NO (CARVALHO *et al*, 2003; REINHARDT; BONDY, 1996).

Essa vasodilatação, endotélio dependente, ocorre pela formação de NO, o qual é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase-endotelial (NOSe). O NO, por sua vez, ativa um mecanismo contra-regulatório que age, via monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), reduzindo o cálcio citoplasmático da célula muscular lisa vascular (CMLV), alterando a permeabilidade vascular, modulando o tônus vascular (HARRISON, 1997).

Além da sua ação vasodilatadora, o NO inibe a adesão e a agregação plaquetária (FURCHGOTT, 1988), impede a proliferação da CMLV, limita o

recrutamento vascular de leucócitos e inibe a produção do fator tecidual, o qual é um determinante crítico na geração do trombo (MOUSA, 2010). O NO estimula a produção de GMPc em plaquetas, que, por sua vez ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), modulando a concentração de cálcio intraplaquetária, o qual, quando reduzido, inibe a agregação das plaquetas (REES, 1989).

Sugere-se que a inibição do nível basal NO por diferentes agentes de agregação, resulta na modulação do cálcio citosólico. O aumento da mobilização intracelular de Ca^{2+} , liberado dos grânulos densos do citoplasma das plaquetas, por sua vez ativa a Fosfolipase A2, liberando AA a partir de fosfolípidos da membrana das plaquetas e, portanto, aumenta a agregação de plaquetas através da síntese da prostaglandina induzida COX (MACHADO *et al.*, 1992).

Sendo assim, do ponto de vista vascular, o NO liberado pelo endotélio, o qual é um importante marcador da função endotelial, medeia ativamente muitas das funções protetoras exercidas pelo endotélio intacto, e, em conjunto com a PGI2, o NO exerce potente efeito antiaterogênico e tromborresistente, prevenindo a adesão e agregação plaquetária (ZAKHARY *et al.*, 1996; FURCHGOTT *et al.*, 1988).

Ressalta-se que, embora existam muitos inibidores de agregação de plaquetas, quase todos medeiam o seu efeito inibitório através do aumento do AMPc ou GMPc e apenas alguns agonistas dentre eles o ADP e o e L-NAME (NG-metil-L-arginina éster de etilo), atuam através da modulação incremental do NO, produzindo efeitos semelhantes sobre a libertação de AA e de mobilização de Ca^{2+} (BARNERJEE *et al.*, 2016; BARNERJEE *et al.*, 2014; (GHOSH *et al.*, 2011).

Além disso, a utilização de L-NAME, reduz os níveis basais de NO plaquetário com o simultâneo acréscimo na síntese de TXA2, ocasionando agregação plaquetária. Isto demonstra que existe uma relação direta entre a agregação de plaquetas e a redução do nível de NO (BARNERJEE *et al.*, 2016; BARNERJEE *et al.*, 2014),

3.3 TERAPIA ANTITROMBÓTICA CONVENCIONAL COM AAS

O AAS é um fármaco do grupo dos antiinflamatórios não esteroidais (AINE) utilizado amplamente com antiinflamatório, antipirético, analgésico, antiagregante e antiplaquetário, sendo a Aspirina sua maior representante comercial. Como todos os AINEs, é um inibidor inespecífico das enzimas ciclooxigenases (COX), enzimas fulcrais da cascata do AA, como citado anteriormente (AKRE, 2001).

O mecanismo de ação do AAS baseia-se na inativação permanente das isoenzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2). Essas isoenzimas catalisam a conversão do ácido araquidônico (derivado dos fosfolípidos da membrana celular via conversão desses fosfolípidos pela fosfolipase A2) em prostaglandina H2 (PGH2). A PGH2 é um intermediário biossintético instável, que dá origem, através de diversas isomerases, a uma série de prostanóides bioativos, incluindo o tromboxano A2 (TXA2) e prostaciclina (PGI2) (PATRONO *et al.*, 2005; VAN LAMMEREN *et al.*, 2011).

O AAS possui uma afinidade muito maior pela COX-1 do que pela COX-2, o que explica a necessidade de doses maiores para a atividade antiinflamatória e analgésica do AAS (uma vez que a maioria dos mediadores inflamatórios associados à dor é produzida via COX-2), se comparadas às doses necessárias à ação antiplaquetária (PATRONO *et al.*, 2005).

As plaquetas maduras expressam apenas COX-1, enquanto o endotélio vascular é capaz de expressar tanto COX-1 quanto COX-2. As plaquetas e o endotélio vascular produzem primariamente TXA2 e PGI2, respectivamente, sendo o TXA2 sintetizado e produzido pelas plaquetas em resposta a uma série de estímulos, como a presença de colágeno, trombina e ADP, induzindo a agregação plaquetária através do receptor de TXA2 acoplado à proteína G. A ligação do TXA2 a seu receptor na superfície das plaquetas leva a uma cascata que culmina na ativação da integrina de membrana $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (também chamada glicoproteína GPIIb /IIIa), que auxilia no processo de agregação entre as plaquetas. O TXA2 apresenta, portanto, uma função na amplificação da resposta da plaqueta a diversos agonistas, além de ser um potente vasoconstritor e pró-aterogênico (PATRONO *et al.*, 2005).

A PGI2, por outro lado, inibe a agregação plaquetária, induz à vasodilatação, inibe a proliferação de células musculares lisas vasculares e protege o miocárdio contra estresse oxidativo, sendo, portanto, antiaterogênica. Devido à menor sensibilidade da COX-2 ao AAS, em doses baixas, não são observados efeitos decorrentes da inibição da COX-2 endotelial, como hipertensão, redução da função renal ou interferência na ação de fármacos diuréticos ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (PATRONO *et al.*, 2005).

Os efeitos antiinflamatórios também são largamente dependentes da inibição da produção de prostanóides, já que estes mediadores são importantes em quase todos os fenômenos associados à inflamação, como vasodilatação, dor e atração de mais leucócitos ao local. Além disso, os salicilatos são eficazes em neutralizar os radicais livres, moléculas produzidas na inflamação e altamente nocivas para os tecidos (LOIOLA, 2001).

Quanto à ação do AAS nas plaquetas sanguíneas, este é particularmente eficaz em inibir a produção de TXA2, resultando na diminuição da tendência de agregação plaquetária, uma vez que as plaquetas são ativadas e se agregam em resposta à libertação de TXA2, presente em seus grânulos. (LICTHMAN *et al.*, 2005). Esse é o primeiro passo na formação de trombos arteriais. Estas ações podem ser dose-dependentes; contudo, há evidências de que doses inferiores a 100 mg por dia podem não inibir a síntese de prostaciclina (LOIOLA, 2001).

Por essas razões, associadas à facilidade de manuseio, aplicação, baixa dosagem necessária para tratamento é que o AAS é amplamente utilizado na prática clínica e o padrão ouro na prevenção de eventos tromboembólicos em paciente com fatores de risco para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (HILLS, 2011).

Cabe ressaltar que absorção do AAS ocorre principalmente no estômago e porções superiores do intestino delgado, por meio de difusão passiva pelas

membranas gastrintestinais (DAI; GE., 2012). Após a absorção, o AAS entra em contato com as plaquetas na circulação portal, onde o fármaco apresenta concentrações muito mais elevadas que na circulação sistêmica (PIGNONE; WILLIAMS, 2010). Embora o tempo de meia-vida do AAS varie de 15-20 minutos, o efeito antiplaquetário dura toda a vida útil da plaqueta, visto que a inibição da COX pelo fármaco é irreversível e, uma vez que as plaquetas são anucleadas, esse efeito pode ser revertido apenas pela geração de novas plaquetas (DAI; GE., 2012; PIGNONE; WILLIAMS, 2010).

Ressalta-se, no entanto, que o AAS possui efeitos adversos, tendo em vista que estudos mostraram que a curto prazo, a administração do AAS em baixas doses pode induzir inflamação da mucosa do intestino delgado (ENDO *et al.*, 2014). Dessa forma, vários estudos e ensaios realizados anteriormente, levaram a um esforço na busca de novos compostos naturais envolvendo a redução dos efeitos adversos relacionados à alteração da agregação plaquetária (CHEN; YANG *et al.* 2015). Como consequência, diversos efeitos protetores de plantas têm sido revelados contra doenças trombóticas, como as trombozes coronárias e a aterosclerose, e diversos estudos experimentais têm sido realizados *in vivo* e *in vitro* (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; WANG; 1999).

3.4 TERAPIA ANTITROMBÓTICA ALTERNATIVA COM PRODUTOS NATURAIS

A fitoterapia ocidental moderna cada vez mais enfatiza os efeitos das ervas em todo sistema corporal (MCEWEN, 2015). Estima-se que atualmente cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos disponíveis derivam de plantas e microrganismos (NEWMAN & CRAGG 2012, CRAGG & NEWMAN 2013). Apresentando-se como uma possibilidade de atuar de forma coadjuvante as terapêuticas atuais (BRUNING, 2012), sua utilização crescente deriva de duas considerações importantes: a primeira, seriam os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. A segunda, é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (YUMES *et al.*, 2010)

Os desfechos inconvenientes que envolvem as atuais terapêuticas antiagregante plaquetárias têm estimulado as pesquisas clínico-científicas a desenvolverem opções que não provoquem os riscos elevados de sangramento, a extensa interação com outros fármacos, o início lento de ação e a necessidade de monitoração plasmática, mas que reproduzam efeitos antitrombóticos semelhantes aos dessa droga (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Nesse cenário, os avanços em pesquisas com a *Campomanesia xanthocarpa* a transformam em um potencial agente alternativo antitrombótico.

3.5 *Campomanesia xanthocarpa*

A *Campomanesia xanthocarpa* Berg pertence à família Myrtaceae, o qual compreende cerca de 3500 espécies, subordinadas a mais ou menos 100 gêneros e apresenta dois centros principais de desenvolvimento: A América tropical e a Austrália (BARROSO, 1991). Dentre seus nomes populares destacam-se “guabirobeira”, “guabiroba”, “guabirova”, “guabirobeira-do-mato”, “guaribagabirobeira”. Tem como sinonímia botânica *Eugenia xanthocarpa* Mart. Non nud *Psidium punctulatum* DC; *Psidium Eugenioides* Camb (LORENZI, 1992). O nome Guabirobeira é do tupi “guabir-oba” e do sufixo português “eira” (CORRÊA, 1984).

A planta é decídua (não perde as folhas facilmente), mesófito até heliófito (desenvolve-se na presença de luz), e seletivo higrófito, sendo abundante nas partes úmidas das matas de altitude. Ocorre em Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formas florestais. Floresce abundantemente durante os meses de setembro-novembro e os frutos amadurecem em novembro-dezembro. A planta frutifica a partir de um a dois anos após o plantio. Os frutos da guabirobeira (figura 2), de acordo com os estudiosos, além de saborosos, são também ricos em vitamina C. O fruto pode ser consumido *in natura* ou na forma de sucos, doces, geléias e ainda serve como matéria-prima para licores, picolés e sorvetes (LORENZI, 1992; BIAVATTI, 2004).

A árvore é silvestre e se multiplica por sementes, possuindo de 15 a 25 metros de altura e 30 a 50 centímetros de diâmetro. Suas folhas são opostas, ovaladas ou oblongas, miúdas, verde-claras, inicialmente transparentes e mais tarde opacas (ALZUGARAY, 1984). As flores são brancas solitárias ou reunidas nas axilas das folhas. O fruto é uma baga globosa achatada, amarelada, comestível, com 5 a 6 sementes coriáceas miúdas (CRAVO, 1994). A árvore fornece madeira branca bastante resistente e a lenha goza de preferência para a sapecagem e torrefação da erva-mate. É classificada como árvore produtora de alimentos para pássaros e suas flores são freqüentemente visitadas pelas abelhas. Os frutos suculentos são apreciados tanto pelos homens quanto pelos animais (ALZUGARAY, 1984). Segundo Barroso (1991), o embrião das sementes das *Myrtaceae* oferece amplo campo de investigação e tem servido de base para sua classificação em tribos, sendo que a *Campomanesia* apresenta uma forma mais especializada do “embrião pimentóide”.

Tal como enfatizou Cravo (1994), a “guabiroba” possui tanino, ferro, glicose, sais minerais, vitaminas A e C. As folhas contêm matéria amarela amarga, clorofila e ácido tânico (CORRÊA, 1984). No trabalho realizado por Limberger (2001), sobre a composição química do óleo volátil das folhas de *C. xanthocarpa* coletadas no Rio Grande do Sul, os autores obtiveram um rendimento de 0,2% em óleo essencial, rico em sesquiterpenos, destacando-se dentre eles o espatulenol (9,9%), o globulol (6,2%) e o epi-globulol (2,0%); e entre os monoterpenos, destaca-se o linalol (17,2%). Segundo Schmeda-Hirschmann (1995), as folhas desta planta possuem flavonóides, entre os quais pode se citar quercetina e rutina. Markman *et al.* (2004) analisou os

componentes fitoquímicos desta espécie e encontrou flavonóides, saponinas e taninos. Apesar de seu uso medicinal, há poucos relatos das propriedades farmacológicas desta planta.

As folhas, conforme Corrêa (1984) são usadas como adstringentes e úteis contra a diarreia e o catarro da bexiga e uretra. Cruz (1995) afirma que as cascas e as folhas em cozimento também podem ser utilizadas contra leucorréias. Notoriamente, existem relatos da utilização tradicional do chá das folhas para a disenteria, problemas do estômago, febre, como agente antiinflamatório, antirreumático e para diminuir o colesterol sanguíneo (ALICE *et al.*, 1995). Segundo Dickel *et al.* (2007), um estudo realizado com os vendedores de erva de uma cidade do Sul do Brasil apresentou que a planta seria usada para efeito potencial no controle de certas condições, associadas à obesidade, tal como hiperlipidemia, sendo utilizada empiricamente para a redução de peso. De fato, a credence popular, pelo menos no sul do Brasil, já vem utilizando, de forma empírica, este chá para reduzir a pressão arterial e o colesterol, mas ainda existem poucos estudos que comprovem sua eficiência.

Fora demonstrado, em um estudo piloto pioneiro, que a *C. xanthocarpa* produziu efeitos semelhantes ao mecanismo das estatinas, reduzindo colesterol LDL e inibindo a atividade da enzima HMG-coa redutase (KLAFKE *et al.*, 2010), ratificando a credence popular do efeito hipolipimiente desta planta em indivíduos hipercolesterolêmicos, abrindo, assim, possibilidades para a ampliação de maiores investigações sobre essa planta. Dentro dessa premissa, mais recentemente, fora confirmado o efeito hipocolesterolêmico dessa planta, através dos achados de Viecili *et al.* (2014), em um estudo que abrangeu um grande número de indivíduos hipercolesterolêmicos, no qual demonstrou-se que a planta possui efeito antioxidante, antiinflamatório além de melhorar a disponibilidade dos níveis de óxido nítrico nestes indivíduos.

Ainda, tomando os resultados do estudo pioneiro da planta (KLAFKE *et al.*, 2010), foi demonstrado a presença de intensa quantidade de taninos, rutina, flavonóides e saponinas (glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determinando a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante, através de análise por cromatografia de camada delgada. O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão as atividades hemolítica, citotóxica e molusquicida, freqüentemente observadas (SIMÕES *et al.*, 1999) e entre elas, possível atividade antiplaquetária (SPARG *et al.*, 2004).

Embora esta planta tenha sido usada na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, e tenha recebido recentemente atenção considerável sobre seus reais efeitos na prevenção primária DAC, nenhuma informação havia sido disponibilizada acerca dos efeitos da *C. xanthocarpa* sobre a agregação plaquetária.

Baseado neste último aspecto fora então realizado outro estudo, direcionado a avaliar um possível efeito na atividade plaquetária, no sentido de melhor entender esse fenômeno com a *C. xanthocarpa*, no qual encontramos atividades antiplaquetária, antitrombótica e fibrinolítica em camundongos (KLAFKE *et al.*, 2012). O extrato da planta inibiu a agregação plaquetária, sem apresentar citotoxicidade, além de ter atividade fibrinolítica sem demonstrar ação ulcerogênica após administração oral do mesmo em camundongos. A atividade antitrombótica foi avaliada induzindo tromboembolismo pulmonar em camundongos, o qual foi caracterizado por ativação massiva das plaquetas circulantes e formação generalizada de trombos na microcirculação pulmonar, onde a utilização do extrato da planta reduziu drasticamente a porcentagem de paralisia pulmonar, mostrando-se eficaz, quando comparada ao ácido acetilsalicílico (AAS), aumentando ainda mais a possibilidade do efeito inibitório desta planta na função plaquetária.

Apesar de terem sido realizados alguns estudos pré-clínicos na área, diversos aspectos importantes referentes ao uso etnofarmacológico da *Campomanesia xanthocarpa* necessitam ser mais bem investigados especialmente seu potencial antiagregante plaquetário em humanos, justificando assim mais estudos, especialmente pesquisas clínicas com esta planta para confirmar seu uso popular.

Nesse contexto, como citado anteriormente, em estudos prévios a *C. xanthocarpa* mostrou uma atividade antiplaquetária, antitrombótica e fibrinolítica em camundongos e não mostrou atividade ulcerogênica na administração oral quando comparado com o AAS (KLAFKE *et al.*, 2012). Resultados anteriores já têm demonstrado que o tratamento com cápsulas de *C. xanthocarpa* reduz o colesterol total sanguíneo e os níveis de LDL em indivíduos hipercolesterolêmicos, e que a planta reduz também o estresse oxidativo e melhora os níveis de óxido nítrico (VIECILI *et al.*, 2014), bem como reduz os níveis de LDL oxidada em camundongos (KLAFKE *et al.*, 2015) tornando-se uma alternativa potencial e terapia complementar para a aterosclerose subclínica (KLAFKE *et al.*, 2016). Dessa forma, a partir das evidências as quais sugerem que o processo inflamatório medeia o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (KASAP *et al.*, 2007), os marcadores pró-inflamatórios podem ter sido reduzidos pela planta a partir do momento em que houve redução dos níveis de colesterol pelo seu efeito antioxidante e hipolipemiante como o das estatinas.

Ainda, é importante ressaltar que assim como o AAS promove acetilação em serina na COX-2, as estatinas promovem uma nitrosilação em cisteína na COX-2, sendo que ambos eventos conduzem para a produção de lipoxinas e resolvinas, contribuindo para a melhora da inflamação vascular (SPITE; SERHAM, 2010). Aqui se encontra a hipótese mais relacionada ao efeito anti-inflamatório da *C. xanthocarpa*, evidenciando na redução dos níveis séricos de IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ em

camundongos hipercolesterolêmicos e no aumento da IL-10 nos mesmos (KLAFKE *et al.*, 2015). Esse resultado anti-inflamatório está de acordo com o estudo de Viecili *et al.* (2014), o qual demonstrou que a *C. xanthocarpa* melhora os níveis de proteína C reativa (PCR), que tem sua produção fortemente influenciada pela IL-6, a qual foi reduzida pela planta. Dessa forma, essa hipótese é evidenciada também por inúmeros estudos que têm demonstrado que as estatinas reduzem a inflamação aguda *in vivo* e que, em parte, isso ocorre através da regulação direta da interação leucócito-endotélio (DINARELLO, 2010; FISCHETTI *et al.*, 2004).

Sugere-se, então, que o impacto benéfico da *C. xanthocarpa* pode ser parcialmente atribuído à liberação de mediadores lipídicos solúveis como lipoxinas e resolvinas, assim como as estatinas e o AAS. Estes fatores têm sido apresentados como participantes da resolução da inflamação em geral (SPITE; SERHAN, 2010). A incapacidade de formação de lípideos que atuam em resolver a inflamação, como lipoxinas e resolvinas, acelera a progressão da aterosclerose, enquanto que a sobre-expressão de 12/15 lipoxigenase específica de macrófagos reduz a carga de aterosclerose através da formação desses mediadores, Interferindo de forma direta na mediação da cascata de coagulação e, por conseguinte, na agregação plaquetária (MERCHED *et al.*, 2008).

Figura 2. Foto ilustrativa das folhas e do fruto de *C. xanthocarpa*.



Fonte: COSTA, 2009.

**Inhibitory effect of *Campomanesia xanthocarpa* in platelet aggregation:
comparison and synergism with acetylsalicylic acid**

Juliana Soares Otero ^{a,b}, Jonatas Zeni Klafke ^{a,b,*}, Gabriela Elisa Hirsch ^{a,b}, Roberta Lelis Dias Pereira ^{a,b}, Amanda Spring de Almeida ^{a,b}, Sabrina Nascimento ^{a,b}, Fernando Garcez Porto ^{a,b}, Aline Schmidt ^{a,b}, Brenda da Silva ^{a,b}, Mônica Jaskulski^{a,b}, Mariana Migliorini Parisi ^{a,b}, Naiara dos Santos Guarda ^c, Rafael Noal Moresco ^c, Carlos Alberto Mayora Aita ^d, Paulo Ricardo Nazário Viecili ^{a,b}

#J. S. Otero and J.Z. Klafke contributed equally to this work.

^a Grupo Multidisciplinar de Saúde (GMS), Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), 98020-290 Cruz Alta, RS, Brazil.

^b Centro de Ensino e Pesquisa (CEP), Instituto de Cardiologia de Cruz Alta (ICCA), 98005-096 Cruz Alta, RS, Brazil.

^c Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

* corresponding authors: Jonatas Zeni Klafke and Paulo Ricardo Nazário Viecili. Centro de Ensino e Pesquisa (CEP), Instituto de Cardiologia de Cruz Alta (ICCA), 98005-096 Avenida Venâncio Aires, nº 1316, Cruz Alta, RS, Brazil. Tel./Fax: +55 55 3221 1500; E-mail: jonzeni@hotmail.com or vieciliprn@uol.com.br

This manuscript has 1 figure and 2 tables.

Abstract:

Background and aims: Cardiovascular diseases of thrombotic origin are related to high mortality and standard therapeutic agent used in this case is acetylsalicylic acid (ASA), but serious adverse events may occur. However, recent data has suggested the plant *Campomanesia xanthocarpa* has antiplatelet activity and could be a viable alternative. In this study we investigated the effects of leaves from this plant in human platelet aggregation.

Methods: 23 healthy subjects were randomly divided into three groups: (1) ASA (100 mg), (2) *C. xanthocarpa* (1000 mg) or (3) synergism (500 mg of *C. xanthocarpa* plus 50 mg of ASA); daily for five days. Antiplatelet activity was determined by turbidimetric method using ADP or arachidonic acid (AA) agonists before, 5 and 8 days after treatments. **Results:** Treatment with *C. xanthocarpa* and synergism caused a reduction of $8 \pm 13.5\%$ and $12.5 \pm 5\%$ in platelet aggregation induced by ADP after 5 days of treatment, respectively, returning to basal levels after 8 days. For AA agonist, 5 days of treatment with *C. xanthocarpa*, ASA or synergism caused a reduction of $46 \pm 15\%$, $36 \pm 12\%$ and $69.3 \pm 6\%$ in platelet aggregation, respectively, and first two groups returned to baseline values 8 days after treatment ended. Synergism group prolonged antiplatelet effect maintaining aggregation reduction after 8 days the end of treatment. **Conclusion:** *C. xanthocarpa* showed antiplatelet action when stimulated by agonist AA, and contributed to the antiplatelet effect when associated with ASA for both agonists, allowing dose reduction to 50 mg.

Keywords: adenosine diphosphate; arachidonic acid; guavirova; medicinal plants; nitric oxide.

1. Introduction

The notion that platelets are of utmost importance for the functioning of immune and hematologic processes reveals its leading role in the genesis of thromboembolic disorders. Platelets are effector cells in hemostasis and, when activated, become highly specialized. Their phenotype transforms, allowing them to participate in additional and inflammatory responses, and thus in turn amplifying processes during thrombopoiesis, which occurs as part of endothelial dysfunction (ED). ED is characterized by a reduction in the production and bioavailability of nitric oxide (NO) which directly affects endothelium-dependent vasodilation and is the starting point of atherosclerosis¹.

Atherosclerosis is a multifactorial process and our understanding of how it develops has evolved systematically². A study showed that risk factors (RFs) for cardiovascular diseases (CVDs) such as dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension, smoking, physical inactivity and obesity act directly on the vascular endothelium^{3,4}. An inflammatory response involving leukocyte recruitment and platelet adhesion occurs when the endothelium becomes dysfunctional, leading to thrombogenesis^{5,6}. With the formation of a thrombus, the artery narrows, causing a blockage of blood supply to the affected area, which in turn results in outcomes, such as cerebrovascular accident (CVA), acute myocardial infarction (AMI), peripheral vascular disease, and promotion of CVDs culminating in increased risk of mortality⁷.

CVD, particularly of thrombotic origin caused by atherosclerosis, is the leading cause of mortality in Brazil⁸. Indeed, the World Health Organization (WHO)⁹ reported

that in 2015 nearly 30% of global mortality was attributed to CVDs, atherosclerosis being its main pathological basis ¹⁰, accounting for about 40% of all mortality in Western society ¹¹. Furthermore, it is estimated that by 2030, over 23.3 million people will die annually from CVD ¹².

Due to the clinical and financial relevance of circulatory thrombogenic diseases, it becomes increasingly important to develop therapies that can mitigate the damage resulting from such injuries, as well as minimizing the costs and side effects of treatments already in place. Among the antiplatelet therapeutic agents, acetylsalicylic acid (ASA) is the most commonly used and therefore the most well-known of its class, and is recommended for primary and secondary prevention of thromboembolic events in CVD patients ^{13, 14, 15}.

The main mechanism of action of ASA is the irreversible inhibition of cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) isozyme activity ¹⁶. This, in turn, catalyzes the conversion of arachidonic acid (AA) ^{16, 17} into prostaglandin 2 (PGH₂), blocking the production of thromboxane A₂. Another form of inhibition arises from the acetylation of the serine molecule (position 529 in COX-1 and 516 in COX-2), which modifies its active site, thus allowing the conversion of AA to 15R-hydroxyeicosatetraenoic acid (15R-HETE) which in turn is converted to 15-epi-LXA₄ by 5-LOX in vascular endothelial cells ¹⁸. This intermediate is then transformed into lipoxins by leukocytes, which have antioxidant and anti-inflammatory effects ^{19, 20}.

Another ASA pathway is the inhibition of nuclear factor kappa B (NFκB), which causes a decrease in proinflammatory activity by regulating the gene expression of interleukins ²¹. NFκB can be activated by the phosphorylation of serines 32 and 36 of IκB resulting from a variety of extracellular stimuli, including proinflammatory cytokines

such as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin (IL). After activation, NF κ B promotes regulation of the expression of multiple genes involved in amplification of the inflammatory response, such as, for example, the expression of COX-2 which is essential for the production of prostaglandins and thromboxanes in the inflammatory process ²².

The use of low doses of ASA (81 mg, single daily dose) recommended by the American Heart Association (2011) ²³ preferentially inhibits TXA₂, a platelet-derived vasoconstrictor, instead of prostacyclin 2 (PGI₂) which is, endothelium-derived ¹³. This differential effect is advantageous, since the production of preserved PGI₂ promotes the antithrombotic and anti-inflammatory properties of the endothelium²⁴.

Despite the need for antiaggregatory therapy, which is of paramount importance in terms of the increased risk cardiovascular, there is still a large part of the population that has no access to primary health care in Brazil and therefore cannot undergo appropriate medical treatment ⁸. In addition, there are side effects relating to short-term ASA use, including mild inflammation of the mucosa of the small intestine, or relating to chronic use, such as multiple petechiae, loss of villi, erosions and ulcers ²⁵. These limitations provide an impetus to clinical and scientific research on developing complementary and alternative antiaggregant therapies ²⁶.

Recent studies have demonstrated the importance of natural products in alternative treatments for various cardiovascular diseases, including those involving platelet aggregation ²⁷. A wide variety of active phytochemicals in plants that inhibit platelet aggregation has been identified, including flavonoids, carotenoids, curcumins, terpenoids, polyphenols, saponins and coumarins ²⁸. Phytotherapy has increasingly drawn attention to the effects of herbs in the body as a whole ²⁹. Thus, several studies

have sought new natural compounds to suppress platelet aggregation without causing adverse effects ^{30, 31}. As a result, different *in vivo* and *in vitro* studies have shown positive effects of plants against atherosclerosis and atherothrombosis ^{32, 33, 34, 35, 36, 37, 38}.

One of these plants is *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularly known as "guavirova". It is present in the south of Brazil, and also found in Argentina, Paraguay and Uruguay. Studies have shown it has a broad spectrum of therapeutic effects ³⁹. For example, it has a lipid-lowering effect ^{33, 35}, similar to that of a statin ³⁴, an anti-inflammatory ³² and antioxidant effect, and also has been shown to have platelet antiaggregant activity, similar to Aspirin®, both *in vitro* and in animal models ^{34, 35}. The studies described how *C. xanthocarpa* can be transformed into a potential alternative and complementary therapy for subclinical atherosclerosis ⁴⁰ and possible into an antithrombotic alternative. However, its antithrombotic biochemical mechanisms are still not clear, and important aspects concerning ethnopharmacological use need to be better investigated, especially regarding antiplatelet activity in humans, which is the research object of our group.

The aim of this study was to determine whether a *C. xanthocarpa* plant extract can change platelet function in previously healthy individuals without risk factors for CVD. The secondary objective was to compare its possible antiplatelet effects to that of the standard drug ASA, and its synergistic potential with said drug. Thus, we seek to better understand the effect of this plant and develop further studies that consolidate this line of research to develop an alternative and innovative therapy for CVD.

2. Materials and Methods

2.1. Selection of participants

The selection of participants was carried out via an open invitation published in the media of Cruz Alta (Rio Grande do Sul - Brazil). We selected the first 30 participants who suited the eligibility criteria and had previously agreed to participate in the study by signing the informed consent.

2.1.1. Eligibility Criteria

2.1.1.1. Inclusion Criteria

The inclusion criteria for the selection of individuals were: physically active individuals, measured by oxygen consumption (VO_2) in a spirometry test after running on a treadmill in a physiology exercise lab, absence of cardiovascular RFs (smoking, sedentary lifestyle, hypercholesterolemia, hypertension, obesity and diabetes mellitus), of either sex, and aged 18-50 years.

2.1.1.2. Exclusion Criteria

Subjects were excluded in the following cases: presence of hypertension ⁸⁰; subjects with abnormal serum cholesterol and triglyceride levels ⁸¹; altered glucose levels ⁸²; subjects who were smokers ⁸³; subjects who had consumed alcohol in the last 5 days; obese subjects ⁸⁴; sedentary subjects ^{85, 86}; and subjects using any drug that can interfere with platelet function, such as ASA derivatives, Piroxicam, Tenoxicam, Indomethacin, Ketorolac, Ibuprofen, Flurbiprofen, Diclofenac, Nimesulide, Ticlopidine, Clopidogrel, oral contraceptives and oral anticoagulants.

2.2. *Participants, treatment and ethical considerations*

Our study had a double-blind, randomized pilot design. Out of the 30 individuals who agreed to participate, 23 were selected and randomly divided into three groups: (1) ASA group, which received 100 mg of ASA ⁸⁷; (2) *C. xanthocarpa* group, which received 1000 mg of *C. xanthocarpa* ³³; and (3) synergism group, which received 500 mg of *C. xanthocarpa* along with 50 mg of ASA. All participants received treatment capsules which had been prepared in a compounding pharmacy and administered orally daily for five days (Figure 1).

This protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the Universidade de Cruz Alta and CONEP, with the opinion number 920,959. When the participants were included in the study, they received the necessary information about the nature and purpose of the study. All of them received nutritional guidelines on restricted diets using foods that interfere with platelet aggregation ⁸. Our research followed the guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for human experimentation. All participants declared their voluntary participation in a signed informed consent.

Please, insert Figure 1 here

2.3. *Plant preparation*

Preparation of the *C. xanthocarpa* plant and extract

Leaves of *C. xanthocarpa* were picked from a tree in the city of Cruz Alta, RS - Brazil (RS; 28°38'19 "S, 53°36'23"W, 452 m) and were identified by the herbarium of

the Universidade de Cruz Alta (no. 1088). The material was sanitized in a process involving a bath in 0.4% sodium hypochlorite solution for one hour, followed by washing in running water for 15 minutes. The method was previously described by Klafke et al (2015). The material was then dried at 40-45°C in a greenhouse and crushed to a fine powder. The same powder was used to prepare the capsules.

2.4. Evaluation of physical fitness

Evaluation of physical fitness

To characterize physical fitness, a VO_2 calculation was taken as a criterion, which was indirectly assessed by the Cardiac Stress Test with the protocol by described by Bruce (1992)⁸⁸. VO_2 is the maximum capacity of the body of a person to transport and metabolize oxygen during an incremental physical exercise; it is the physiological variable that most accurately reflects the aerobic capacity of a person. It has been used as a parameter for pathophysiological studies, in adaptation to stress and physical training⁸⁹.

Individuals with physical fitness considered optimal with VO_2 above 40ml/kg/min were considered suitable for the study (Cooper table)⁸⁹.

2.5. Blood collection

Blood samples were taken before treatment, for control purposes, and on the first day after the end of treatment, for verification of antiplatelet activity. Moreover, an additional collection was performed on the eighth day after the end of treatment for

analyzing the recovery of platelet function, adding up to five days of treatment and 13 days monitoring the effect.

2.5.1 Blood processing

Blood was obtained by venipuncture of the median brachial vein, with a 20 ml syringe before treatments (baseline), and 1 and 8 days after the end of treatments. For analyzing platelet aggregation, blood was immediately placed into tubes containing 3.8% sodium citrate (Vacuplast®), at 9 volumes of blood to 1 volume of sodium citrate.

2.5.2 Obtaining platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP).

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 500 rpm for 10 minutes at room temperature. Plasma separation was performed carefully so as to avoid platelet activation. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained by sediment centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes at room temperature.

2.5.3. Platelet Count

Twenty μl of PRP was diluted in 980 μl of 1% saline-formalin solution. Counting was performed in a semi-automated analyzer ABX MICROS 60 OT using electrical impedance. Human platelet suspensions were adjusted at the average concentration of 300 000 platelets/ μl .

2.6. Evaluation of Platelet Aggregation

2.6.1 Turbidimetric method

The antiplatelet activity of the treatments was determined in citrated PRP of the participants through the turbidimetric method described by Born & Cross (1962), and monitored on a Qualitem® platelet aggregometer of single channel. This method consists of monitoring platelet aggregation by light transmittance. A light beam of 240 nm wavelength crosses the PRP, an opaque platelet suspension, corresponding to 0% transmittance, which after adding the aggregating agent becomes progressively translucent in proportion to the formation of aggregates, allowing for increased light passage and a consequent increase in transmittance. The device was calibrated so that PRP corresponded to 0% transmittance and PPP corresponded to 100% transmittance. The records were obtained by the AggroLink v. 5.1 software.

Platelet aggregation was recorded until the maximum aggregation and during, at most, the 5 minutes after the addition of agonists. Platelet aggregation was expressed as a percentage of aggregation for arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP).

2.6.2. Aggregation agonists

In human PRP, 1.5 mM of AA and 10 μ M of ADP were used. The concentrations of the agonist chosen were concentrations at which submaximal platelet aggregation could be induced. During the experiment, the agonists were kept at 0°C.

2.7. Evaluation of NO bioavailability

To evaluate NO bioavailability, the indirect measurement of NO metabolites nitrite and nitrate (NO_x) was performed. Blood samples were immediately placed in tubes containing clot activator (Vacuplast®) and centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes to obtain serum. NO_x levels were measured according to the technique described by Tastch et al. (2010) by use of Cobas Mira® automated system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). NO_x levels were expressed in µmol/L.

2.8. Statistical analysis

Results were presented as mean ± standard deviation, in addition to descriptive data. All results were analyzed using the Kolmogorov test for checking the homogeneity of the sample. For the parametric samples an ANOVA test was performed, followed by a Nelman-Keuls post-test. For the non-parametric samples Kruskal-Wallis test was performed, followed by Mann-Whitney's. A p-value less than 0.05 was considered as an indicator of a significant difference between groups (* $p < 0.05$), and the F-value resulted from the interaction treatment *versus* time. All tests were performed in GraphPad Prism, version 6.0.

3. Results

Some characteristics of the selected subjects are shown in Table 1. There were no significant differences in VO₂, age and gender between the participants of the three groups studied before the beginning of the treatments. There were also no significant differences in the analysis of intergroup NO_x, before the beginning and after the end of the treatment (1 day after) when compared to baseline levels (Table 2).

Please, insert table 1 here.

Please, insert table 2 here.

2.1. C. xanthocarpa associated with ASA showed antiplatelet effect when stimulated by the ADP agonist

When evaluating platelet aggregation induced by the ADP agonist, individuals of the ASA and synergism groups showed significant reduction of $13.5 \pm 8\%$, ($F(2,20)=3.3791$, $p=0.05$), and $12.5 \pm 5\%$ (MW: 4.500, P: 0.0025) respectively when compared to their baseline values (before treatment) and one day after the end of treatment, returning to the initial values eight days after the end of treatment (Table 2).

For this agonist, individuals of the *C. xanthocarpa* group did not obtain a reduction in platelet aggregation on the first and eighth days after the end of the treatment, remaining unchanged when compared to their baseline levels of platelet aggregation (Table 2).

In an analysis comparing the antiaggregatory effect of different groups on the first day after the end of treatment, the ASA group ($F(2,20) 5.750$, P 0.009) had a superior effect to the other groups when stimulated by the ADP agonist (Table 2).

3.2. C. xanthocarpa and its association with ASA exhibited antiplatelet effect when stimulated by the AA agonist

When evaluating platelet aggregation induced by the AA agonists, individuals of the *C. xanthocarpa*, ASA and synergism groups showed a significant reduction of $46 \pm 15\%$ ($KW(2,20)=6.923$ $p=0.0240$), $36 \pm 12\%$ ($F(2,20)=4.916$ $p=0.0276$) and $69 \pm 6\%$ ($F(2,20)=59.72$ $p=0.0001$), respectively, when compared to their baseline values,

one day after the end of the treatment. The *C. xanthocarpa* and ASA groups returned to baseline values eight days after the end of the treatment. The synergism group remained under an antiaggregatory effect, exhibiting a reduction in platelet aggregation of $66 \pm 2\%$ ($F(2,20)=59.72$ $p=0.0001$) eight days after the end of the treatment (Table 2).

A comparative analysis of the antiaggregatory effects of the different groups on the first day after the end of treatment when stimulated by the AA agonist showed that the different treatments have the same effect ($F(2,20) 0.4308$, $P 0.657$) (Table 2).

4. Discussion

CVD is the leading cause of death worldwide ⁴¹. The increased activity of coagulation factors, particularly platelet hyperaggregation, by interfering directly with the hemostatic processes can, when combined with the RFs for CVDs, accelerate thromboembolic processes ^{42, 43}. Plant-based studies exhibited a positive role in maintaining health by altering the progression of CVDs. One of these roles is in the antiplatelet effect, which has been gaining attention and expanding interest in further studies ^{29, 44, 45, .}

Thus, this study demonstrated the antiplatelet ability via the induction of AA of *C. xanthocarpa* (1000 mg) alone and when administered in association with low doses of aspirin (50 mg) in humans (500 mg *C. xanthocarpa*), highlighting its synergistic power on the ADP pathway. In agreement with these results, a previous study showed that *C. xanthocarpa* Berg acts similarly to ASA, demonstrating an antiplatelet effect in mice ³⁵.

The pathway of platelet aggregation dependent on AA metabolism is of great antithrombotic biological importance, since its major metabolite, thromboxane A₂ (TXA

2), is the most potent aggregating agent and vasoconstrictor ⁴⁶. In this sense, the discovery of agents that act in this pathway ²² becomes an alternative for creating new strategies for the prevention of diseases that progress with hyperactivity of platelets, such as thrombosis, while aiming at reducing the adverse effects caused by conventional drugs.

When evaluating platelet aggregation through the AA agonist, individuals of the *C. xanthocarpa* group showed a significant reduction of $46 \pm 15\%$ a day after the end of treatment, when compared to their baseline values. A comparison of the antiplatelet effects between groups showed that different treatments presented similar effects, making clear the antiplatelet effect of the plant on platelets when compared to ASA.

Studies on medicinal plants showed that many of them affect platelet function^{47, 48, 49}. Accordingly, an *in vitro* study looking at the antiplatelet activity of ginger, using human whole blood of 10 healthy volunteers, found a decrease in platelet aggregation when induced by AA, showing even greater potency than ASA⁵⁰. Krivoy et al. (2001)⁵¹ conducted a study involving the administration of 240 mg/day of salicin, derived from willow bark extract, to 19 volunteers, whereas placebo was administered to 16 other participants. In both groups, patients suffered from acute exacerbations of chronic lower back pain. A third group with stable chronic ischemic heart disease was treated with 100 mg of ASA a day. This study demonstrated that the daily consumption of willow bark inhibited platelet activity, reducing the average aggregation induced by AA. However, the plant did not show a greater antiplatelet effect compared to the group that received aspirin ⁵¹.

Still, further studies support the observations of the effects of various phytochemicals in platelets involving the AA pathway. For example, flavonoids are potent inhibitors of platelet aggregation by various pathways, but mainly due to its involvement in AA cascade, related to the activity of both COX and thromboxane A2 synthase ⁵². Thieleche *et al* (2009) ⁵³, stated that green tea consumption (*Camellia sinensis*), as a drink or a supplement, has an inverse relationship with CVD-related mortality. These results are in agreement with those of the present study, since *C. xanthocarpa* also has flavonoids in its phytochemical constitution ³⁵. Currently, *in vitro* and *ex vivo* studies relate the antiplatelet activity of green tea mainly with the presence of flavonoids, which are its main bioactive component. Flavonoids likely act by inhibiting platelet aggregation induced by ADP, AA, collagen, epinephrine and calcium ionophore A23187 in a dose-dependent manner, in a mechanism involving the metabolism of AA by the cyclooxygenase pathway (COX) ^{54, 55}.

Previous studies from our group ³⁵ identified levels of saponins, tannins, terpenes, rutin and flavonoids in the leaves of *C. xanthocarpa* in the same manner as observed by Markman *et al* (2004) ⁵⁶. Confirming and corroborating the results previously observed by Pastori *et al.* (2013) ⁵⁷, analysis by HPLC-DAD of the plant extract for that *C. xanthocarpa* batch, revealed the presence of the following phytochemicals: gallic acid (3.05%), chlorogenic acid (1.92%), quercetin (1.85%) and rutin (4.13%). The analysis then detected the faint presence of flavonoids (quercetin, rutin and kaempferol) and phenolic acids (gallic and chlorogenic acid) in the plant composition ³².

Yet, studies have shown that saponins, flavonoids, coumarins and terpenoids are bioactive compounds with antiplatelet activity ^{58, 59, 60}. These phytochemicals act

by interfering with different signaling pathways of platelets, via the inhibition of ADP and AA pathways and TXA₂ formation and reduction of Ca²⁺ intracellular mobilization, among others ⁵⁴. The effects observed in this study may explain the antiplatelet biological activity of *C. xanthocarpa*, at least in part, due to the presence of its above-described constituents, since they already have their antiplatelet effects elucidated in scientific literature ²⁹.

Another important pathway of platelet aggregation which has been evaluated in this study was ADPs which when released by platelets, when adhered to endothelial receptors, after injury promotes their adhesiveness and aggregation, participating in the formation of clots ⁶¹. Unlike the results found for the AA pathway, *C. xanthocarpa* showed no antiplatelet effect *per se*, when stimulated by the ADP agonist. However, when *C. xanthocarpa* was administered in association with low doses of aspirin, there was an antiplatelet effect. This is one of the most important findings of this study, since the maximum effect achieved by the 100 mg dose of ASA needed to prevent CVDs ²³, was equal to the maximum effect obtained by the combination of half a dose of ASA (50 mg) and half a dose of *C. xanthocarpa* (500 mg). This suggests that this combination could be an effective alternative to reduce the dose of ASA currently used, and may also reduce the side effects associated with its chronic use.

In two *in vivo* studies using garlic extract, there was no change in platelet aggregation in response to induction by the ADP agonist. When 7.2 g of garlic extract aged for five days were administered, and its effects on platelet aggregation to that of the placebo ⁶² after induction by ADP was studied, no change in platelet activity was observed. The same result was seen in another study that evaluated platelet function before and after four hours of consuming capsules containing 9.9 g of garlic or placebo

⁶³. This suggests that many phytomedicines do not interfere in this pathway of platelet aggregation. Nevertheless, in a third four-week study with five healthy men and ten patients (40-60 years) with CAD who each received a dose of 2 g of garlic three times a day, it was observed that the platelet aggregation rate in response to ADP was significantly reduced in healthy subjects. However, the authors did not specify the intensity of this effect ⁶⁴.

In a study on chamomile (*Matricaria chamomilla*), characterized by having anti-inflammatory power and composed, among others, by flavonoids (including quercetin), its antiplatelet effect was demonstrated after long-term use; however, there was no antiplatelet effect in the short term ⁶⁵. When administered orally to 10 participants for a relatively long period (eight years), the plant showed no inhibitory response on platelet aggregation when induced by ADP or thrombin during the 3.5 first years, as compared to subjects of the control group, to whom chamomile was not administered for at least six months. It was noted, however, that the threshold to show decreased platelet aggregation response occurred after taking *Matricaria* continuously and daily for more than four years ⁶⁶, emphasizing the importance of treatment duration for observing the antiplatelet effects. This result was different from the present study, since *C. xanthocarpa* was able to inhibit platelet aggregation after a short administration time.

Another plant, hawthorn (*Crataegus oxyacantha*), which also has flavonoids among its many active constituents (e.g. rutin, found in *C. xanthocarpa*)⁶⁷, had its antiplatelet potential studied. In an *in vitro* evaluation, it was found that the hawthorn extract had the ability to inhibit platelet aggregation induced by ADP ⁶⁸, corroborating the antiplatelet effects of flavonoids. However, further studies with this plant have yet

to be performed in order to verify its performance *in vivo*, both in animal models and in humans.

Still, it is noteworthy that two plants mentioned above, garlic and chamomile, showed platelet inhibition after long term use/administration^{64, 68, 69}. Likewise, after 90 days of oral administration of the encapsulated powder of the leaves of *C. xanthocarpa* in hypercholesterolemic individuals, Viecili et al.³³ observed important effects in the inflammatory process, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid modulation of these individuals. These observations reveal the importance of extending treatment with *C. xanthocarpa* in a future study, so that we can verify whether, under these conditions, its phytochemicals, which are also found in the aforementioned herbs, will be able to maintain platelet inhibition; thus helping to elucidate its metabolic pathways.

Another important point to emphasize in this study is the results observed for the evaluation of NOx levels. NO is generated endogenously by nitric oxide synthase (eNOS) using L-arginine as a substrate by converting nitrites and nitrates derived from food, and its bioactivity can be restored by antioxidants⁷⁰. In the study by Viecili et al. (2014)³³, treatment with the plant for 90 days improved NOx levels, likely for having improved oxidative levels that were elevated in hypercholesterolemic individuals. In the present study, however, the subjects evaluated were healthy, as they did not have risk factors and engaged in physical exercise, and thus probably had less oxidative stress and, consequently, greater NO bioavailability. Accordingly, it is believed that the increased blood flow during exercise or shear-stress activates eNOS, increasing the levels of NO⁷¹. Indeed, at the end of treatment with *C. xanthocarpa* for five days, it was noticed that the plant had no effect on the NOx production pathway. One hypothesis is that flavonoids, which are present in *C. xanthocarpa*, would be capable

of modulating, in a short time, the presence of blood nitrites and oxidative stress with a resulting increase in NO bioavailability, but this hypothesis was not confirmed. Perhaps this hypothesis could be confirmed in individuals with RFs for having high levels of inflammatory and atherothrombotic biomarkers ⁴¹.

The reports that platelet aggregation induced by ADP results from reduced synthesis of NO with consequent increased release of TXA₂, leading to platelet aggregation with negative correlation between NO and TXA₂ ($r = -0.986$, $P < 0.001$), indicate that they are highly but negatively correlated ^{72, 73}. Associated with the fact that the treatment used by Viécili *et al.* (2014) ³³ was for 90 days, while this lasted only five days, our suggestions that either the effect of *C. xanthocarpa* is dose/time-dependent for the synthesis of NO or the fact that its action is not through the ADP pathway are reinforced.

It is noted that there are several pertinent findings regarding the influence of phytochemicals on platelet function. It is also known that platelet function is important for the success of hemostatic processes ⁷. In this scenario, there is growing interest from researchers and clinicians in developing more effective antithrombotic drugs that bring fewer adverse effects.

In this context, the antiplatelet profile of medicinal plants is already a recurring subject of studies, as demonstrated in the literature ^{27, 74, 75, 76, 77, 78, 79}, and *C. xanthocarpa* is also the subject of studies regarding its effect on platelet activity.

In the study by Klafke *et al.* (2012) ³⁴, the plant showed no cytotoxicity in platelets, and in the study by Viécili *et al.* (2014) ³³, no changes in liver and kidney functions were seen, demonstrating a lack of toxicity. These results described above may explain, at least in part, the effect of this plant as antiplatelet agent. However,

these same results point to the need for further clarification as to other platelet activation pathways of *C. xanthocarpa*. Thus, it is suggested that further studies be performed, both *in vitro* and *in vivo*, in order to clarify the different mechanisms of action on platelets.

Thus, the exact mechanisms of *C. xanthocarpa* on the inhibition of platelet aggregation are still not fully understood and the molecular mechanisms of the plant on platelets needs to be better investigated. This plant is a strong candidate to be considered as a new antiplatelet therapy alternative, and may in the future be utilized in drug and nutraceutical supplement development.

This study has evidenced that *C. xanthocarpa* has an antiplatelet effect at the dose of 1000 mg for 5 days and at the dose of 500 mg with a combination of low doses of ASA (50 mg) in healthy individuals.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Author Contributions: The following was used by Amanda Spring de Almeida, Aline Schmidt and Brenda da Silva which carried out the experiments; Juliana Otero, Gabriela Elisa Hirsch, Roberta Lelis Dias Pereira, Naiara dos Santos Guarda, Mônica Jaskulski, Fernando Garcez Porto and Mariana Migliorini Parisi performed the experiments; and Juliana Soares Otero e Jonatas Zeni Klafke analyzed the data; Sabrina Nascimento, Rafael Noal Moresco and Carlos Alberto Mayora Aita contributed reagents/materials/analysis tools; Juliana Soares Otero, Jonatas Zeni Klafke and Paulo Ricardo Nazário Viecili wrote the paper. Author senior: Paulo Ricardo Nazário Viecili.

Acknowledgments: This study was supported by the Instituto de Cardiologia de Cruz Alta (ICCA). Fellowships from the Programa Institucional de Bolsas de

Iniciação Científica – PROBIC/FAPERGS are also acknowledged. The teacher Carina Mion Garlet, which held the platelet count. Cristiano Kuntz Almeida for doing some blood collections. Sulfarma Manipulation Drugstore who sponsored the manufacture of capsules for the treatment of individuals.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Study organization

REFERENCES

1. FAVERO, G; PAGANELLI, C; BUFFOLI, B; RODELLA, L; REZZANI, A. **Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention.** Research International. Volume 2014. BioMed, 2014.
2. BAHIA, L. e cols; **The endothelium in the metabolic syndrome.** Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. vol.50, no.2. São Paulo. Apr, 2006 .
3. BADIMON, L.; VILAHUR G. **Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture.** Journal of Internal Medicine. Volume 276, Issue 6. 2014.
4. SILVA, E.L.; TSUSHIDA, T.; TERAQ, J. **Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides.** Arch Biochem Biophys: 349, 313-320, 2011
5. SANTOS, S. H. DA; MORESCO, R. N. **Cardiac biomarkers for assessment of acute coronary syndrome [Abstract in English]** Scientia Medica, 2011.
6. GLAGOV S, WEISENBERG E, ZARINS CK, STANKUNAVICIUS R, KOLETTIS GJ. **Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.** N Engl J Med. ;316:1371–5, 1987
7. OLIVEIRA,I.; GIRÃO, M. J. B. C.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S. S. **Platelets: traditional and nontraditional roles in hemostasis, inflammation and câncer.** ABCS Health Sci.; 38(3):153-161, 2013

8. DATASUS - <http://www.datasus.gov.br/> **Departamento de Informática do SUS.** Ministério da Saúde. Governo do Brasil, 2014.
9. OMS. Organização Mundial da Saúde. **Doença cardiovascular.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/em/index.html>> . Acesso em: 10 fev. 2015.
10. FUSTER, V.; KELLY, B. B. **Meeting the Challenges in Developing Countries;** National Academies Press. Washington, 2010.
11. SOEHNLEIN, O., **Resolving atherosclerosis.** Sci. Transl. Med. 7, 275–277, 2015.
12. LOZANO R , NAGHAVI M , FOREMAN K *et al* . A mortalidade global e regional de 235 causas de morte por 20 grupos de idade em 1990 e 2010: uma análise sistemática para o Global Burden of Disease Study 2010 . Lancet ; 380 : 2095 – 128, 2012
13. CLARKE, R. I. *et al.* **Suppression of thromboxane A2 but not systemic prostacyclin by controlled-release aspirin.** N Engl J Med, v. 325, p. 1137-1141, 1991.
14. CYRUS, T *et al.* **Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin.** Atherosclerosis, v. 184, p. 8-14, 2006.
15. HENNEKENS, C.H. **Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease.** Am J Manag Care, v. 8, p. 691-700, 2002.
16. PATRONO C, GARCÍA RODRÍGUEZ LA, LANDOLFI R, BAIGENT C. **Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis.** N Engl J Med.;353(22):2373-83, 2005
17. W VAN LAMMEREN, G. *et al.* **Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque.** Current cardiology reviews, v. 7, n. 1, p. 22–7, fev. 2011.
18. SPITE, M.; SERHAN, C. N. **Novel lipid mediator promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins.** Circ Res, v. 10, p. 1170-1184, 2010
19. CHIANG, N. *et al.* Aspirin triggers anti-inflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. **Proc Natl Acad Sci**, v. 101, p. 15178-15183, 2004;

20. CHIANG, N. *et al.* **Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.73, p. 163-177, 2006
21. BLANCO, M.L.; NETO, A.C. **O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas anti-inflamatórias.** *Rec. Cien. Med. Campinas*. 12(4): 341-349, 2003
22. PATRONO, C.; ANDREOTTI, F.; ARNESEN, H.; *et al.* **Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis.** *Eur Heart J*, v. 32, p. 2922-2932, 2011.
23. American Heart Association. **Statistics Committee and Stroke.** *Eur Heart J*;32(23):2989-97, 2011
24. KUMMER, C. L. and COELHO, T. B. R. B.. **Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais.** *Rev. Bras. Anesthesiol.* [online]. 2002, vol.52, n.4, pp.498-512.
25. JOHNSON, S. **Known knows and know unknowns: Risks associated with combination antithrombotic therapy.** *Thromb Res*, v. 123, p. S7-S11, 2008.
26. FABIO FIRENZUOLI AND LUIGI GORI. **Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues.** *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007 Sep; 4(Suppl 1): 37–40
27. Chen, C., F. Q. Yang, Q. Zhang, F. Q. Wang, Y. J. Hu and Z. N. Xia. **Natural Products for Antithrombosis.** *Evid Based Complement Alternat Med*: 876426, 2015
28. CRAIG, W. J. **Health-promoting properties of common herbs.** *Am J Clin Nutr*;70(3,Suppl):491S–499S, 1999
29. MCEWEN BJ. **The influence of diet and nutrients on platelet function.** *Semin Thromb Hemost*, 2014; 40(2):214–226
30. LAU, A.J.; TOH, D.F.; CHUA, T.K.; PANG, Y.K.; WOO, S.O.; KOH, H.L. **Antiplatelet and anticoagulant effects of Panax notoginseng: comparison of raw and steamed Panax notoginseng with Panax ginseng and Panax quinquefolium.** *J Ethnopharmacol*, v. 125, p. 380-386, 2009.
31. RYU, K.H.; HAN, H.Y.; LEE, S.Y.; JEON, S.D.; IM, G.J.; LEE, B.Y.; KIM, K.; LIM, K.M.; CHUNG, J.H. **Ginkgo biloba extract enhances antiplatelet and antithrombotic**

- effects of cilostazol without prolongation of bleeding time.** Thromb Res, v. 124, p. 328-334, 2009.
32. KLAFFE et al., **Study of oxidative and inflammatory parameters in Ildr-ko mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of campomanesia xanthocarpa and acetylsalicylic acid.** Phytomedicine, 2015
33. VIECILI P.R.; BORGES D.O.; KIRSTEN K.; MALHEIROS J.; VIECILI E.; MELO R.D.; TREVISAN G.; DA SILVA M.A.; BOCHI G.V.; MORESCO R.N.; KLAFFE J.Z. **Effects of Campomanesia xanthocarpa on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals.** Atherosclerosis. v. 234, 85-92, 2014.
34. KLAFFE, J.Z.; DA SILVA, M.A.;ROSSATO, M. F.;TREVISAN, G.; WALKER, C.I.B.; LEAL, C.A.L.; et al. **Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of Campomanesia xanthocarpa.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 954748 – 8, 2012.
35. KLAFFE, J. Z.; DA SILVA, M.A.; PANIGAS, T.F.; BELLI, K.C.; DE OLIVEIRA, M.F.; BARICHELLO, M.M.; et al. **Effects of Campomanesia xanthocarpa on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemics patients.** Journal of Ethnopharmacology, v.2, p. 299 – 305, 2010.
36. PAPOUTSI, Z. et al. **Walnut extract (Juglans regia L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483.** The British journal of nutrition, v. 99, n. 4, p. 715–22, abr. 2008
37. KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A. *et. al.* **Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and câncer.** American Journal of Medicine, v. 113(9), p. S71–S88, 2002
38. WANG, H.X.; NG, T.B. **Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities.** Life Sci, v. 65, p. 2663-2677, 1999
39. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, Volume 1.** 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
40. KLAFFE, J. Z.; HIRSCH, G. E. ; PARISI, M. ; PORTO, F. ; ALMEIDA, A. S. ; TREVISAN, G. ; VIECILI, P. R. N. . Biomarkers of Subclinical Atherosclerosis and

Natural Products as Complementary Alternative Medicine. Current Pharmaceutical Design (Print), v. -, p. ---, 2016.

41. GO, A.S., MOZAFFARIAN; ROGER, V.L. **Statistics committee and stroke statistics subcommittee. Heart disease and stroke statistics 2014 update**: are port from the American Heart Association. *Circulation*;129(3): e28–e292, 2014
42. RUGGERI ZM. **Platelets in atherothrombosis**. *Nat Med*; 8:1227-234, 2002
43. RUGGERI ZM, MENDOLICCHIO GL. **Adhesion mechanisms in platelet function**. *Circ Res.*;100(12):1673-85, 2013
44. FONTANA P, ZUFFEREY A, DAALI Y, RENY JL. **Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway**. *J Cardiovasc Transl Res*:7(1):29–38, 2014
45. BRADLEY et al. **Differences in sensitivity to the fungal pathogen Batrachochytrium dendrobatidis among amphibian populations**. *Conservation Biology*. Volume 29, No. 5, 2015
46. LUO, W.; LIU, B.; ZHOU, Y. **The endotelial cyclooxygenase pathway: insights from mouse arteries**. *Eur. J. Pharm.*, 2016
47. RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. **Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes**. *International journal of preventive medicine*, v. 5, n. 8, p. 927–46, ago. 2014
48. X.CHEN, X. WANG, R. GUAN, T.TU, Z. GONG, N. ZHENG, J. YANG, Y. ZHANG AND YING, **food funct.**, 2015
49. McEwen, PhD, MHIthSc; Bradley J. **The Influence of Herbal Medicine on Platelet Function and Coagulation: A Narrative Review**. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41:300–314
50. NURTJAHJA-TJENDRAPUTRA E, AMMIT AJ, ROUFOGALIS BD, TRAN VH, DUKE CC. **Effective anti-platelet and cox-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger**. *Thromb Res*: 111(4-5): 259-265, 2003
51. KRIVOY N, PAVLOTZKY E, CHRUBASIK S, EISENBERG E, BROOK G. **Effect of salicis cortex extract on human platelet aggregation**. *Planta Med* 2001;67(3):209–212

52. KARLICKOVA, J., M. RIHA, T. FILIPSKY, K. MACAKOVA, R. HRDINA AND P. MLADENKA. **Antiplatelet Effects of Flavonoids Mediated by Inhibition of Arachidonic Acid Based Pathway.** *Planta Med* **82**(1-02): 76-83, 2016
53. THIELECHE, F; BOSCHMANN, M. **The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome.: A review.** *Phytochemistry.* 2009;70(1):11–24
54. CHENG, T. O. **Green tea may inhibit warfarin.** *Int J Cardiol ;* 115(2):236, 2007
55. YOUSAF S, BUTT MS, SULERIA HA, IQBAL MJ. **The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia.** *Food Funct;* 5(3):545–556, 2014
56. MARKMAN, B. E. O. *et al.* **Antiulcerogenic Effects of *Campomanesia xanthocarpa*.** *J Ethnopharmacol,* v. 94, p. 55-57, 2004.
57. PASTORI, T., FLORES, F.C., BOLIGON, A.A.. **Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system.** *Pharm. Biol.* 51 (10). 543, 2013
58. ROHMER, M. **The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants.** *Nat Prod Rep* 16(5): 565-574, 1999
59. JULIE, A. ROSS; CHRISTINE, M. KASUM. **Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety.** *Annu. Rev. Nutr.,* 22, 19–34, 2002
60. MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. **Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases.** *Current Opinion in Lipidology,* v. 16, p. 77-84, 2005
61. ROSSI AG, NORMAN KE, DONING-GALE D, SHOUP TS, EDWARDS R. **The role of complement, PAF and leukotriene B4 in a reserved passive Arthus reaction.** *Br J Pharmacol* 1007:44-49, 1992
62. RAHMAN K, BILLINGTON D. **Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits adp-induced platelet aggregation in humans.** *J. Nutr;*130(11):2662–2665, 2000

63. WOJCIKOWSKI K, MYERS S, BROOKS L. **Effects of garlic oil on platelet aggregation: a double-blind placebo-controlled crossover study.** Platelets;18(1):29-34, 2007
64. BORDIA A, VERMA SK, SRIVASTAVA KC. **Effect of garlic on platelet aggregation in humans: a study in healthy subjects and patients with coronary artery disease.** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids;55(3):201–205,1996
65. PAREEK A, SUTHAR M, RATHORE GS, BANSAL V. **Feverfew (Tanacetum parthenium L.): a systematic review.** Pharmacogn Rev; 5(9):103 –110, 2011
66. BIGGS MJ, JOHNSON ES, PERSAUD NP, RATCLIFFE DM. **Platelet aggregation in patients using feverfew for migraine.** Lancet; 2(8301):776, 1982
67. WANG J, XIONG X, FENG B. **Effect of Crataegus usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach.** Evid Based Complement Alternat Med:1493-63, 2013
68. ROGERS KL, GRICE ID, GRIFFITHS LR. **Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments.** Eur J Pharm Sci;9(4):355–363, 2000
69. WALSH PN, BIGGS R. **The role of platelets in intrinsic factor-Xa formation.** Br J Haematol. 1972 Jun;22(6):743–760
70. IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS. **Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical.** Circ Res; 61:P866-P879, 2006
71. MAEDA, S., TANABE, T., MIYAUCHI, T., IEMITSU, M., TAKANASHI, M., IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., YOKOTA, T., OHMORI, H. AND MATSUDA, M. **Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta.** Acta Physiologica Scandinavica. 2003, 178: 3–10.
72. BANERJEE D, MAZUMDER S, SINHA AK. **The role of inhibition of nitric oxide synthesis in the aggregation of platelets due to the stimulated production of thromboxaneA₂.** Blood Coagul Fibrinol. 2014; 25:585–591
73. BANERJEE, D.; MAZUMDER, S.; SINHA, A.K. **Involvement of Nitric Oxide on Calcium Mobilization and Arachidonic Acid Pathway Activation during Platelet**

- Aggregation with different aggregating agonists.** Int J Biomed Sci. Mar; 12(1): 25–35. 2016
74. GADI et al, **Flavonoids purified from parsley inhibit human blood platelet aggregation and adhesion to collagen under flow.** Journal of Complementary and Integrative Medicine: Volume 9, Iss. 1, artigo 19; 2012
75. HANSEN, A., SPATH, B., BOKEMEYER, C., LANG, F. **Succinate reverses *in-vitro* platelet inhibition by acetylsalicylic acid and P2Y receptor antagonists.** Platelets ,Vol. 23 , Iss. 1, 2012.
76. DAHMER, T., M. BERGER, A. G. BARLETTE, J. RECK, JR., J. SEGALIN, S. VERZA, G. G. ORTEGA, S. C. GNOATTO, J. A. GUIMARAES, H. VERLI AND G. GOSMANN. **"Antithrombotic effect of chikusetsu saponin IVa isolated from Ilex paraguariensis (Mate)."** J Med Food **15**(12): 1073-1080, 2012
77. JAGROOP, INDERA ANITA; **Plant extracts inhibit adp-induced platelet activation in humans: their potetial therapeutic role as adp antagonists;** Purinegic Signalling: volume 10, 233-239, 2014
78. MIRA et al; **Antiplatelet and anticoagulant activities of angelica shikokiana extract and its isolated compounds.** Clini cal and Applied Trombosis/Hemostasis, 2015
79. YOON et al; **Anticoagulant and antiplatelet activities of scolymoside;** BMB Rep.; 48(10): 577-582, 20015
80. **VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO – DBH VI/2014**
81. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemia – Arquivos Brasileiros de Cardiologia, - Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013**
82. MILECH, A. et. al.; **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016**
83. MIRRA, A.P. et al. **Projeto Diretrizes: Tabagismo.** São Paulo: Associação Médica Brasileira, Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2011.
84. MATOS AF, OLIVEIRA J, GUEDES EP, CARRARO L, LOPES AC, MANCINI MC, SUPLYCY HL, BRITO CLS, BYSTRONSKI DP, MOMBACH KD, STENZEL LM, REPETTO G, RADOMINSKI RB, HALPERN ZSC, VILLARES SMF, ARRAIS RF, RODRIGUES MDB, MAZZA FC, BITTAR T, BENCHIMOL AK. **3 a Edição Diretrizes**

Brasileiras de Obesidade. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (Abeso) São Paulo, 2009.

85. **Diretriz em Cardiologia do Esporte e do Exercício da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte.** Arq Bras Cardiol. 2013;100(1supl.2):1-41
86. **Consenso Nacional de Ergometria.** Arq Bras Cardiol., Volume 65, (Supl. 1). **2012**
87. SMITH, S.C. J.; FELDMAN, T.E.; HIRSHFELD, J.W. J.; JACOBS, A.K.; KERN, M.J.; KING, S.B.; et al. **American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines;** American College of Cardiology/American Heart Association/Society for Cardiovascular Angiography and Interventions Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention. ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). Circulation, v.1, p.156-75, 2006
88. BRUCE, RA - **Exercise testing of evaluation of ventricular function.** N Engl J Med; 296: 671,1977
89. NELSON, M.E.; REJESKI, W.J.; BLAIR, S.N. *et al.* **Physical activity and public health in adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association.** Circulation. 166(9). p.1094-105, 2016

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações cardiovasculares, com destaque na gênese de patologias tromboembólicas associadas a disfunção plaquetária, são uma das principais causas de morte em todo o mundo, elevando o fardo econômico social. O papel dos compostos químicos isolados a partir de plantas na administração profilática e terapêutica de doenças cardiovasculares tem se mostrado promissor. Desde então, o mundo tem modificado seu interesse na pesquisa de ervas medicinais, evidenciando uma gama de papel multifacetado desses fitoquímicos para saúde cardíaca. Esses experimentos com plantas visam torná-las uma prática concreta e aplicável no campo público-profissional e conferir-lhes espaço no meio acadêmico e na atuação em saúde, em âmbito multiprofissional, a despeito da dominância do modelo biomédico na construção da ciência, na formação e na prática desses profissionais.

Diante deste estudo, podemos aprofundar os conhecimentos da ação da planta *Campomanesia Xanthocarpa*, um fitoterápico que tem apresentado benefícios na sua administração quando comparadas as drogas de uso corrente no controle de fatores de risco para DCVs. No particular alteração da agregação plaquetária, objeto do presente trabalho, ficou clara sua ação ocasionando inibição da mesma, quando induzida pelo AA, bem como seu efeito sinérgico ao AAS, quando induzido pelo agonista ADP. Contudo o mecanismo exato do pó da *C. xanthocarpa* sobre a inibição da agregação plaquetária ainda é incerto e a compreensão dos mecanismos moleculares da planta sobre as plaquetas necessitam ser melhores investigados.

Desta forma, essa nova planta, em forma de pó ou de extrato, tem se apresentado como grande candidata a ser considerada uma nova alternativa terapêutica na prevenção de fatores de risco que desencadeiam DCVs, podendo, futuramente, ser explorados por ambas as indústrias de nutracêuticos e farmacêuticos como indícios promissores para a concepção de medicamentos e suplementos nutracêuticos.

Não como território exclusivo, mas como ação compartilhada e interdisciplinar no cuidado à saúde, refletir sobre as implicações éticas e legais do emprego de plantas medicinais no cuidado da saúde se faz necessário, uma vez que há necessidade de configuração e delimitação desse recurso como instrumento legítimo de extensão da prática do cuidado realizada pelos profissionais da saúde. Os resultados deste estudo, em conjunto com os da literatura científica, além de renderem o manuscrito em anexo também apontam para a necessidade de se avançar nos estudos sobre os constituintes etno-farmacológicos de plantas, para que se possa aumentar aplicabilidade da prescrição de ervas medicinais e, assim, legitimá-las como recurso terapêutico em nossa prática multiprofissional.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A busca de composto fitoterápicos é um procedimento complexo que implica que se tenha em consideração diversos fatores como as características fitoquímicas das plantas e seus constituintes etno-farmacológicos, sua possível interação com fármacos adjuvantes às terapêuticas atuais nas mais diversas patologias, bem como, considerar a situação clínica dos pacientes. É por esta razão que se sugere no futuro a realização de estudo, randomizado e controlado, em que:

- As concentrações plasmáticas de fitoterápicos a testar fossem mensuráveis;
- A amostra fosse constituída pelo grupo experimental e o grupo de controle, representativa da população.

Para além dos ensaios realizados a nível clínico, faz-se necessário a ampliação dos conhecimentos acerca das propriedades da *C. xanthocarpa* no seu âmbito biomolecular, desta forma é oportuno realizar ensaios farmacocinéticos, isto é:

- Obter valores de concentrações plasmáticas de fitoterápicos, permitindo relacionar de forma fidedigna a concentração com a ocorrência de eventos adversos. Estes estudos são também muito importantes para determinar o tempo de meia vida de eliminação
- Compreender os mecanismos de ação intracelulares dos constituintes fitoquímicos da *C. xanthocarpa*, aprofundando nossa análise sobre as vias das COXs e LOXs;
- Estudar possíveis interações medicamentosas, uma vez que os fitoterápicos podem interferir com diversos fármacos, tornando imperativo esse detalhamento.

7. REFERÊNCIAS

1. AKRE K, A M EKSTRÖM, L B SIGNORELLO, et. al. **Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden.** *Br J Cancer*, 2001
2. ALEXANDRU *et al*, **Circulating microparticles and endothelial progenitor cells in atherosclerosis: pharmacological effects of irbesartan.** *J Thromb Haemost.*, 2012.
3. ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ L. A.; BRASIL E SILVA, G. A. A; JOSÉ, K. F. D. **Plantas Medicinais De Uso Popular: Atlas Farmacognóstico**, Ulbra, Canoas, Brasil, 1995.
4. ALLFORD SL, MACHIN S. *JHaemostasis. Medicine*, 2004.
5. ALMEIDA GAN, LOUREIRO SR, SANTOS, JE. **Obesidade mórbida em mulheres 5 Estilos alimentares e qualidade de vida.** *Arch Latinoam Nutr.* 2001.
6. ALZUGARAY, D. *et al.* **Primeira enciclopédia de plantas do Brasil.** 1984.
7. *American Heart Association. Statistics Committee and Stroke.* *Eur Heart J;* 2011
8. AUSTIN, SK; *Haemostasis. Medicine.* 2009..
9. BADIMON, L.; VILAHUR G. **Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture.** *Journal of Internal Medicine*, 2014
10. BAHIA, L. e cols; **The endothelium in the metabolic syndrome.** *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia.* São Paulo, 2006.
11. BANERJEE D, MAZUMDER S, SINHA AK. **The role of inhibition of nitric oxide synthesis in the aggregation of platelets due to the stimulated production of thromboxaneA₂.** *Blood Coagul Fibrinol.* 2014.
12. BANERJEE, D.; MAZUMDER, S.; SINHA, A.K. **Involvement of Nitric Oxide on Calcium Mobilization and Arachidonic Acid Pathway Activation during Platelet Aggregation with different aggregating agonists.** *Int J Biomed Sci.* 2016
13. BARROSO, G.M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil.* **UFV**, v. 2, p. 114-121, 1991.
14. BIAVATTI, M.W. *et al.* **Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macber. Aqueous extract: weight control and biochemical parameter.** *J Ethnopharmacol*, v. 93, 2004.
15. BRAR SS, TEN BERG J, MARCUCCI R, et al. **Impact of platelet reactivity on clinical outcomes after percutaneous coronary intervention.** A collaborative meta-analysis of individual participant data. *J Am Coll Cardio*, 2011

16. BROOKS, P.; Emery, E.; Evans F. **Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2.** *Rheumatology*, v.38, 1999
17. BURNSTOCK G. **Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells.** *Pharmacol Rep.* 2008
18. CARVALHO, Luís Carlos - **Marcadores Inflamatórios de Instabilidade da Placa Aterosclerótica Coronária: Caracterização e Potencial Utilização Clínica;** Tese de Doutorado em Medicina Interna/ cardiologia - Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, 2012.
19. CASTRO *et al.* **Platelets: still a therapeutical target.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.42 no.5 Rio de Janeiro Oct. 2006
20. CATTANEO M. **New P2Y(12) inhibitors.** *Circulation.* 2010
21. CHAKRABORTY A, BHATTACHARYYA M. ***Phytotherapy in the Management of Diabetes and Hypertension.*** *Diabetes, hypertension and cardiovascular disease—an unsolved enigma;* 2012
22. Chen, C., F. Q. Yang, Q. Zhang, F. Q. Wang, Y. J. Hu and Z. N. Xia. **Natural Products for Antithrombosis.** *Evid Based Complement Alternat Med;* 2015
23. CHIANG, N. *et al.* **Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,** v.73, p. 163-177, 2006
24. CHIANG, N. *et al.* **Aspirin triggers anti-inflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial.** *Proc Natl Acad Sci,* v. 101, p. 15178-15183, 2004;
25. CLARKE, R. I. *et al.* **Suppression of thromboxane A2 but not systemic prostacyclin by controlled-release aspirin.** *N Engl J Med,* v. 325, p. 1137-1141, 1991.
26. CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** *Imprensa Nacional,* p. 509-510, 1984.
27. CRAIG, W. J. **Health-promoting properties of common herbs.** *Am J Clin Nutr;*70(3,Suppl):491S–499S, 1999
28. CRAVO, A. B. **Frutas e ervas que curam.** *São Paulo,* 5 ed, p. 108-109, 1994.
29. CRUZ MA, YUAN H, LEE JR, WISE RJ, HANDIN RI. **Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF a domain polypeptides.** *J Biol Chem.* 1995
30. CYRUS, T *et al.* **Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin.** *Atherosclerosis,* v. 184, p. 8-14, 2002.
31. DAI, Y.; GE, J. **Clinical use of aspirin in treatment and prevention of cardiovascular disease.** *Thrombosis,* v. 2012, p. 245037, 2012.

32. BRASIL (DATASUS) - <http://www.datasus.gov.br/> **Departamento de Informática do SUS**. Ministério da Saúde. Governo do Brasil, 2014.
33. DICKEL, M.L. *et al.* **Plantas populary used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil**. *J Ethnopharmacol*, v. 109, p. 60-71, 2007.
34. DIEDRICH B, REMBERGER M, SHANWELL A, *et al.* **A prospective randomized trial of a prophylactic platelet transfusion trigger of 10×10^9 per L versus 30×10^9 per L in allogeneic hematopoietic progenitor cell transplant recipients**. *Transfusion*. 2005
35. DINARELLO C. A. **Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family**. *Annual Review of Immunology*. 2010
36. ENDO A., KURODA M., TSUJITA Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J. Antibiot*, 1976
37. FAVERO, G; PAGANELLI, C; BUFFOLI, B; RODELLA, L; REZZANI, A. **Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention**. BioMed Research International. 2014
38. FELIZZOLA *et al.* **Papel do endotélio vascular na fisiologia circulatória**, *CIR VASC ANGIOL* 12 :129-136. 1996
39. FISCHETTI *et al.*, **Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor**. *Blood*, 2004
40. FRANCO, G.C.N., MORETTI, D., CAVALCANTE, P.F.C., LOPES, L.C. **Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia**. *Rev. de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, v. 18, n.1, p.75-81, 2006.
41. FREEDMAN, J. e. **Molecular Regulation of Platelet-Dependent Thrombosis**. *Circulation*, v. 112, p. 2725 – 2734, 2005.
42. FURCHGOTT RE, VANHOUTTE PM - **Endothelium-derived relaxing and contracting factors**. *FASEB J*, 3: 2007- 2018,1989.
43. FURIE B, FURIE BC. **Mechanisms of thrombus formation**. *N Engl J Med* 2008.
44. FUSTER, V.; KELLY, B. B. **Meeting the Challenges in Developing Countries**; National Academies Press. Washington, 2010.
45. GAILANI, D.; HO, D.; SUN, M.F.; CHENG, Q.; WALSH, P. N. **Model for a factor IX activation complex on blood platelets: dimeric conformation of factors Kia is essential**. *Blood.*, v.97, p.3117 – 3122, 2010.
46. GAY, L.J; Felding-Habermann, B. **Contribution of platelets to tumour metastasis**. *Nature Reviews Cancer* 11, 123-134; 2011.
47. GENTRY PA. **Comparative aspects of blood coagulation**. *Veterinary Journal of London*. 2003.

48. GERDES *et al*; **Platelet CD40 Exacerbates Atherosclerosis by Transcellular Activation of Endothelial Cells and Leukocytes**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016.
49. GHOSH, *et al*; **Platelet CD36 surface expression levels affect functional responses to oxidized LDL and are associated with inheritance of specific genetic polymorphisms**. *Blood*. 2011
50. GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. Goodman & Gilman's **the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.
51. GOODMAN, L., TORRES, B., PUNKE, J., REYNOLDS, L., SPEAS, A., ELLIS, A., BUDSBERG, S. **Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model**. *J Vet Intern Med*, v.23, p.56-62, 2009
52. GUIMARÃES, Jordana; ZAGO, Alcides José. **Anticoagulação ambulatorial**. *Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre*, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 30-38, 2010.
53. HAMBERG, M., SVENSSON, J. & SAMUELSSON, B. **Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins**. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974
54. HARRISON MJ AND WEISBLATT E. **A sex difference in the effect of aspirin on “spontaneous” platelet aggregation in whole blood**. *Thromb Haemost* 1997
55. HECHLER B. **The platelet P2 receptors in thrombosis**. *Semin Thromb Hemost*. 2005.
56. HENNEKENS, C.H. **Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease**. *Am J Manag Care*, v. 8, p. 691-700, 2002.
57. HILÁRIO, M.O.E., TERRERI, M.T., LEN, C.A. **Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2**. *J Pediatr*, v.82, n.5, 2006
58. HILLS LD, SMITH PK, ANDERSON JL, BITTL JA, BRIDGES CR, BYRNE JG, ET AL; **American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; Society of Cardiovascular Anesthesiologists; Society of Thoracic Surgeons**. *J Am Coll Cardiol*. 2011.
59. JOHNSON, S. **Known knows and know unknowns: Risks associated with combination antithrombotic therapy**. *Thromb Res*, v. 123, p. S7-S11, 2008.
60. KASAP, S., GÖNENÇ, A., SENER, D.E., HISAR, I. **Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal probrain natriuretic Peptide**. *J. Clin. Biochem. Nutr*; 2007
61. KATZUNG BG **Farmacologia: básica e clinica**. 6 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

62. KLAFKE et al., **Study of oxidative and inflammatory parameters in ldlr-ko mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of campomanesia xanthocarpa and acetylsalicylic acid.** *Phytomedicine*, 2015
63. KLAFKE, J. Z. ; HIRSCH, G. E. ; PARISI, M. ; PORTO, F. ; ALMEIDA, A. S. ; TREVISAN, G. ; VIECILI, P. R. N. . **Biomarkers of Subclinical Atherosclerosis and Natural Products as Complementary Alternative Medicine.** *Current Pharmaceutical Design (Print)*, 2016.
64. KLAFKE, J. Z.; DA SILVA, M.A.; PANIGAS, T.F.; BELLI, K.C.; DE OLIVEIRA, M.F.; BARICHELLO, M.M.; et al. **Effects of Campomanesia xanthocarpa on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemics patients.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.2, p. 299 – 305, 2010.
65. KLAFKE, J.Z.; DA SILVA, M.A.;ROSSATO, M. F.;TREVISAN, G.; WALKER, C.I.B.; LEAL, C.A.L.; et al. **Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of Campomanesia xanthocarpa.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 954748 – 8, 2012.
66. KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A. *et. al.* **Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and câncer.** *American Journal of Medicine*, v. 113(9), p. S71–S88, 2002
67. KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A. *et. al.* **Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and câncer.** *American Journal of Medicine*, v. 113(9), p. S71–S88, 2002
68. KUMMER, C. L. and COELHO, T. B. R. B.. **Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais.** *Rev. Bras. Anesthesiol.* [online]. 2002.
69. KVATERNICK, V., POLLMEIER, M., FISCHER, J., HANSON, P.D. **Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses.** *J Vet Pharmacol Therap*, v.30, p.208-217, 2007.
70. LAU, A.J.; TOH, D.F.; CHUA, T.K.; PANG, Y.K.; WOO, S.O.; KOH, H.L. **Antiplatelet and anticoagulant effects of Panax notoginseng: comparison of raw and steamed Panax notoginseng with Panax ginseng and Panax quinquefolium.** *J Ethnopharmacol*, v. 125, p. 380-386, 2009.
71. LEE JJ, Jin YR, Lim Y, Hong JT, Kim TJ, Chung JH, Yun YP. **Antiplatelet activity of carnosol is mediated by the inhibition of TXA2 receptor and cytosolic calcium mobilization.** *Vasc Pharmacol*; 2006
72. LEES, P., LANDONI, M.F., GIRAUDEL, J., TOUTAIN, P.L. **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-**

- inflammatory drugs in species of veterinary interest.** J Vet Pharmacol Therap, v.27, p.479-490, 2004.
73. LICTHMAN, M.; BEUTLER, E.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T.; SELIGSOHN, U.; PRCHAL, J. Williams Hematology, 2005.
74. LIMBERGER, R.P. et al. **Aromatic plant from Brazil-chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae).** The Journal of Essential Oil Research, v.13, p.113-5, 2001.
75. LOIOLA, A. **Drogas Antiagregantes Plaquetárias Parte I: Atualização.** Revista Boa Saúde online, 7 de fevereiro de 2001. Acesso em 20 de dezembro de 2014.
76. LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil.** São Paulo, p. 256, 1992.
77. LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil.** São Paulo, 3ª ,. ed. Vol 02. 2009
78. LOZANO R , NAGHAVI M , FOREMAN K *et al* . **A mortalidade global e regional de 235 causas de morte por 20 grupos de idade em 1990 e 2010: uma análise sistemática para o Global Burden of Disease Study 2010 .** Lancet ; 380 : 2095 – 128, 2012
79. LUO, W.; LIU, B.; ZHOU, Y. **The endotelial cyclooxygenase pathway: insights from mouse arteries.** Eur. J. Pharm., 2016
80. MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALLBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L. A. C.; 10 CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. **Trypanosoma-cruzi infected cardiomyocytes produce 11 chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity.** 12 Am. Heart Association, v. 102, p. 3003-3008, 2000.
81. MARKMAN, B. E. O. *et al.* **Antiulcerogenic Effects of *Campomanesia xanthocarpa*.** J Ethnopharmacol, v. 94, p. 55-57, 2004.
82. MARNETT, L.J. **The COXIB experience: A look in the rear-view mirror.** Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.49, p.265-290, 2009
83. MCEWEN, PHD, MHLTHSC; BRADLEY J. **The Influence of Herbal Medicine on Platelet Function and Coagulation: A Narrative Review.** Semin Thromb Hemost 2015.
84. MERCHED, A. J., K. KO, K. H. GOTLINGER, C. N. SERHAN, AND L. CHAN. **Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators.** FASEB J. 2008.
85. MOUSA SA, JESKE WP, FAREED J. **Prasugrel: a novel platelet ADP P2Y(12) receptor antagonist.** Methods Mol Biol; 2010
86. MURAKAMI, M.; KUDO, I. **Phospholipase A2.** Journal. Biochemistry, Tokyo, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2003

87. NEWMAN DJ, CRAGG GM. In: RSC Biomolecular Sciences No 18; Natural Product Chemistry for Drug Discovery. Buss AD, Butler MS, editors. Royal Society of Chemistry; Cambridge, UK: 2013.
88. NEWMAN, D. J.; CRAGG G. M. **Natural Products Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis**. National Cancer Institute–Frederick, P.O. Box B, Frederick, Maryland 21702, United States *J. Nat. Prod.*, 2012.
89. OFFERMANN S. **Activation of platelets function through G protein-coupled receptors**. *Circulation Research*. V. 99, p.1293-1304, 2006.
90. OLIVEIRA, I.; GIRÃO, M. J. B. C.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S. S. **Platelets: traditional and nontraditional roles in hemostasis, inflammation and cancer**. *ABCS Health Sci.*; 38(3):153-161, 2013
91. PAPOUTSI, Z. et al. **Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483**. *The British journal of nutrition*, v. 99, n. 4, p. 715–22, abr. 2008
92. PATRONO C, GARCÍA RODRÍGUEZ LA, LANDOLFI R, BAIGENT C. **Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis**. *N Engl J Med.*;353(22):2373-83, 2005
93. PIGNONE, M.; WILLIAMS, C. D. **Aspirin for primary prevention of cardiovascular disease in diabetes mellitus**. *Nat Rev Endocrinol*, v. 6(11), p. 619-628, 2010.
94. RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R. **Farmacologia**. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007
95. REES, D. D., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989.
96. REINHARDT RR, BONDY CA. **Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain**. *Neuroscience*. 1996
97. RIVERA J, LOZANO ML, NAVARRO-NÚÑEZ L, VICENTE V. **Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation**. *Haematologica*. 2009
98. ROSEMBERG, S. **Recent advances in the molecular biology of hepatitis C**. *J. Mol. Biol.*, v. 313, p. 451-464, 2001
99. ROZALSKI M, WATALA C **Antagonists of platelet fibrinogen receptor are less effective in carriers of PI(A2) polymorphism of beta(3) integrin**. *Eur J Pharmacol*; 2005.
100. RYU, K.H.; HAN, H.Y.; LEE, S.Y.; JEON, S.D.; IM, G.J.; LEE, B.Y.; KIM, K.; LIM, K.M.; CHUNG, J.H. **Ginkgo biloba extract enhances antiplatelet and antithrombotic effects of cilostazol without prolongation of bleeding time**. *Thromb Res*, v. 124, p. 328-334, 2009.

101. SAMPLE, J. W., J. E. ITALIANO, JR., AND J. FREEDMAN. **Platelets and the immune continuum**. Nat. Rev. Immunol. 2011.
102. SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. **Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamy* species**. Fitoterapia, v. 66, p. 373-674, 1995.
103. SHAPIRO SS. "Treating thrombosis in the 21st century". *N. Engl. J. Med.* 2003.
104. SHARMA G, BERGER JS. **Platelet Activity and Cardiovascular Risk in Apparently**
105. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al, ***Farmacognosia: da Planta ao medicamento***. 9ed. Porto Alegre/Florianópolis Ed.Universiade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999.
106. SIMOONS, M.L. **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. 2001
107. SOEHNLEIN, O., **Resolving atherosclerosis**. Sci. Transl. Med. 7, 275–277, 2015.
108. SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J.V. **Biological activities and distribution of plant saponins**. J Ethnopharmacol, v. 94, p. 219–243, 2004.
109. SPITE, M.; SERHAN, C. N. **Novel lipid mediator promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins**. *Circ Res*, v. 10, p. 1170-1184, 2010
110. STEGNER, D.; NIESWANDT, B. **Platelet receptor signaling in thrombus formation**. Journal of Molecular Medicine. February 2011
111. VAN LAMMEREN, G. W.; MOLL, L. F.; BORST, G. J. *et. al.* **Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque**. Curr Cardiol Ver, v. 7(1), p. 22-7, 2011.
112. VIECILI P.R.; BORGES D.O.; KIRSTEN K.; MALHEIROS J.; VIECILI E.; MELO R.D.; TREVISAN G.; DA SILVA M.A.; BOCHI G.V.; MORESCO R.N.; KLAFKE J.Z. **Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals**. Atherosclerosis. v. 234, 85-92, 2014.
113. W VAN LAMMEREN, G. et al. **Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque**. Current cardiology reviews, v. 7, n. 1, p. 22–7, fev. 2011.
114. WANG, H.X.; NG, T.B. **Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities**. Life Sci, v. 65, p. 2663-2677, 1999

115. WANG, H.X.; NG, T.B. **Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities.** Life Sci, v. 65, p. 2663-2677, 1999.
116. YEDGAR, S., KRIMSKY, M., COHEN, Y., FLOWER, R. **Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword?** Pharmacological Sciences, v.28, n.9, p.459-464, 2007
117. YOUSAF S, BUTT MS, SULERIA HA, IQBAL MJ. **The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia.** Food Funct; 5(3):545–556, 2014
118. YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C; CECHINEL, F.V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Quím. Nova 2010.

8. ANEXOS

Table 1. Subject characterizing parameters

Parameters	<i>C. xanthocarpa</i>	ASA	Synergism
Age (years)	25 ± 7	29 ± 9	30 ± 11
Gender	1.4 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1.2 ± 0.4
VO ₂ :ml/kg/min	58 ± 13	49 ± 9	45 ± 8
“n”	8	7	7

Results were presented as mean ± standard deviation

ASA- Acetylsalicylic acid

VO₂- maximum capacity of the body of a person to transport and metabolize oxygen during incremental physical exercise

No difference was observed; (1-way ANOVA followed by Nelman-Keuls)

Table 2. Platelet aggregation parameters of healthy individuals before (baseline) and after (1 and 8 days) End of treatment

Parameters		<i>C. xanthocarpa</i>			AAS			Synergism		
		baseline	1	8	baseline	1	8	baseline	1	8
platelet aggregation (%)	ADP-induced	75 ± 13	75 ± 8	76 ± 16	77 ± 11	64 ± 7 ^c	75 ± 13	85 ± 7	75 ± 5 ^a	77 ± 11
	AA-induced	60 ± 30	15 ± 16 ^{ad}	60 ± 27	50 ± 26	15 ± 12 ^{ad}	25 ± 13	81 ± 20	9 ± 6 ^{ad}	12 ± 3 ^b
NOx (µmol/L)		86 ± 23	60 ± 33	-	82 ± 77	53 ± 25	-	55 ± 53	68 ± 96	-

Platelet aggregation was expressed as a percentage of aggregation for arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP).

- p < 0.05 result of intra- group analysis; statistical tests used were ANOVA 1 VIA followed by Newman Keuls test .
- P < 0.002 a result of intra- group analysis; statistical tests were used Kruskal- Wallis followed by Mamn -Whitney .
- P = 0.0098 result analysis inter group 1 day after the end of treatment ; statistical tests used were ANOVA 1 VIA followed by Newman Keuls test .
- P = 0.0098 result analysis inter group 1 day after the end of treatment ; statistical tests used were ANOVA 1 VIA followed by Newman Keuls test .
- NS when compared to other groups 1 day after the end of treatment ; The statistical test used was ANOVA 1 VIA .
- No statistical difference was observed in intra analysis and inter- groups , for NOx variante before and 1 day after the end of treatment ; The statistical test used was Kruskal- Wallis followed by Dumn`s



Universidade de Cruz Alta
Grupo Multidisciplinar de Saúde – GMS

Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães –
Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6 - Parada Benito
CEP: 98.020-290 - Cruz Alta/RS
E-MAIL: icccientifica@hotmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Efeito da *Campomanesia xanthocarpa* na agregação plaquetária: comparação e sinergismo com o ácido acetilsalicílico.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Paulo Ricardo Nazário Viecili

Instituição/Departamento: Universidade de Cruz Alta/ Grupo Multidisciplinar de Saúde

Telefone para contato: (55) 9149-5116

Pesquisadores participantes: Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke

Telefones para contato: (54) 9156-1879

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue, levando em consideração que você possui o tempo que achar adequado para decidir participar da pesquisa, podendo refletir e consultar, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajuda-lo(a) na tomada de decisão livre e esclarecida. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

-Descrição da pesquisa: As folhas da planta *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecida como "guavirova", presente na região Sul do Brasil são usadas empiricamente, como infusão, na medicina popular para tratar doenças inflamatórias e hipercolesterolemia, criando assim um vasto campo de oportunidades para estudos e investigações. Neste sentido, tomando a planta como uma das linhas de investigação do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a *Campomanesia Xanthocarpa* possui efeito hipolipimiente oral, semelhante ao produzido pelas estatinas. Verificou-se também que a planta possui intensa quantidade de saponinas, que tem muitas atividades biológicas, entre elas, uma possível atividade antiplaquetária. Então foi realizado um segundo estudo direcionado a avaliar um possível efeito na atividade plaquetária, no sentido de melhor entender esse fenômeno com a *C. xanthocarpa*, onde encontramos atividades antiplaquetária, antitrombótica e fibrinolítica em camundongos. Assim, devido à importância deste novo campo de estudo que a *C. Xanthocarpa* vem apresentando, somado aos resultados na inibição plaquetária em modelo animal descrito acima quando comparada com o ácido acetilsalicílico (AAS), e baseado na necessidade de se estudar a viabilidade de novos compostos terapêuticos, o presente estudo objetiva

investigar os efeitos da *C. xanthocarpa* na função plaquetária de humanos, para melhor compreender o efeito dessa planta e aprofundar ainda mais os estudos e investigações que alicerçam essa linha de pesquisa, estimulando uma possível terapêutica alternativa e inovadora.

-Objetivo: com esse trabalho pretendemos esclarecer a possível ação antiplaquetária da planta, a qual representa uma importante ferramenta alternativa para descoberta de novos fármacos.

-Detalhamento dos procedimentos: Os indivíduos serão aleatoriamente divididos em quatro grupos: (1) grupo placebo, o qual receberá o veículo do tratamento, (2) grupo *C. xanthocarpa*, o qual receberá 500 mg de *C. xanthocarpa* (Klafke et al, 2010), (3) grupo AAS, o qual receberá 100 mg de AAS (Smith et al., 2006), (4) grupo *C. xanthocarpa* + AAS, o qual receberá 250 mg de *C. xanthocarpa* juntamente com 50 mg de AAS, diariamente por cinco dias.

-Forma de acompanhamento: Serão realizadas coletas sanguíneas antes do tratamento, para fins de controle, no quinto dia de tratamento, para verificação da atividade inibitória máxima. Além disso, serão realizadas duas coletas adicionais, no segundo e oitavo dias após o tratamento, para a análise da recuperação da função plaquetária. Salienta-se que cada coleta envolverá a retirada de 10 mL de sangue através de punção venosa. Em seguida, serão realizadas as análises para fins de monitorização da agregação e da ativação plaquetária encontradas em cada coleta de sangue, para verificar o efeito dos tratamentos utilizados.

-Especificação dos riscos: Os possíveis riscos da coleta de sangue são a ocorrência de desconforto durante o procedimento e a aparição de um leve hematoma devido a coleta. O tratamento da planta empregado no estudo não oferece riscos aos participantes voluntários, uma vez que foram realizadas pesquisas onde os participantes fizeram o uso de cápsulas contendo *C. xanthocarpa* durante três meses, sendo que esta não demonstrou efeitos adversos. Já o AAS é amplamente usado pela população e só oferece riscos se administrado a longo prazo (como pode ser visto nos possíveis efeitos adversos descritos abaixo), o que não é o caso deste estudo. Cabe salientar que não foi encontrada nenhuma alteração considerável com relação a exames clínicos laboratoriais com o uso de AAS.

De qualquer modo, seguem os possíveis efeitos adversos do uso de AAS: Os distúrbios gastrintestinais são os mais comuns. Doses elevadas (que não são utilizadas em nosso estudo) causam náusea, vômito e dor gástrica em 10% a 30% dos pacientes. A fim de diminuir a irritação gástrica do ácido acetilsalicílico, é aconselhável ingeri-lo junto com alimento ou um copo cheio d'água ou leite. Pode causar hemorragias ocultas em cerca de 70% dos pacientes. Em casos excepcionais pode ocorrer anemia. Aumenta a incidência da úlcera péptica em pacientes com artrite reumatoide, devido ao uso por período prolongado. Pode ativar a úlcera e precipitar hemorragia maciça, risco este que aumenta quando tomado concomitantemente com álcool. Insuficiência renal, mais comum em pacientes que sofrem de doença renal. Tratamento prolongado pode causar salicilismo, cujos sintomas são zumbido nos ouvidos, cefaleia, vertigem e confusão. Diversos defeitos para o feto, pois atravessa rapidamente a barreira placentária. Retardamento do trabalho de parto quando usado

no fim da gestação. Síndrome de Reye, doença rara, mas grave, em crianças que sofrem de influenza viral ou varicela. Por esta razão, o uso em crianças abaixo de 12 anos deve ser orientado pelo médico.

- Medidas de urgência e acompanhamento do episódio, no caso de alguma intercorrência: Em caso de uma intercorrência, procure imediatamente o médico responsável pela pesquisa (contatos disponibilizados abaixo) ou um Centro de Intoxicações, mesmo na ausência de sinais e sintomas. Recomendam-se medidas usuais para reduzir a absorção do princípio ativo, acelerar a excreção e monitorar o balanço hídrico e eletrolítico, normalizar a temperatura e a atividade respiratória.

-Especificações dos benefícios: O pesquisador assegura aos participantes da pesquisa as condições de acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação, bem como acesso aos seus resultados e exames. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. As observações populares sobre o uso da *Campomanesia xanthocarpa* e a eficácia desta planta medicinal contribuirão de forma relevante para a divulgação de suas virtudes terapêuticas, apesar de não ter seus mecanismos bioquímicos ainda bem esclarecidos, sendo objeto de pesquisa de nosso grupo. Grande parte da população ainda não tem acesso ao atendimento primário em saúde e por isso não realiza o tratamento medicamentoso adequado à terapia antiagregante plaquetária, o que é de suma importância tendo em vista o aumento do risco cardiovascular que este fato representa. Para esta maioria da população, a fitoterapia pode funcionar como uma alternativa à manutenção da saúde. Apesar de terem sido realizados alguns estudos pré-clínicos na área, diversos aspectos importantes referentes ao uso etnofarmacológico da *Campomanesia xanthocarpa* necessitam ser melhor investigados, como sua atividade antiplaquetária, previamente demonstrada in vitro e em modelo animal (Klafke et al., 2012), justificando assim nosso estudo. Dessa maneira, espera-se contribuir científica e tecnologicamente nesse âmbito através da criação de linhas e condutas de utilização desta planta, comparando seus efeitos com o AAS, estimulando uma possível terapêutica alternativa e inovadora, que trará benefícios a toda população.

-Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

-Comitê de Ética em Pesquisa: O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um órgão colegiado interdisciplinar e independente, com “munus público” de caráter consultivo, deliberativo e educativo. Foi criado para defender os interesses dos sujeitos de pesquisa em sua integralidade e dignidade, além de contribuir no desenvolvimento de pesquisa dentro de um padrão ético. O CEP tem como objetivos regular, analisar e fiscalizar a realização de todos os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, seguindo as propostas de diretrizes éticas.

-Garantia de sigilo/ “informação confidencial”: Se você concordar em participar do estudo, assegura-se que seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo e o Comitê de Ética terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo. O pesquisador compromete-se formalmente através deste

documento preservar o anonimato dos participantes do estudo quando houver a divulgação dos resultados do projeto. Além disso, qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material armazenado em local seguro. Os dados serão anonimizados antes de serem encaminhados pela equipe de pesquisa do participante do estudo para qualquer outra instância utilizando senhas específicas que identifiquem o participante apenas pelo pesquisador principal, sendo que esta etapa inclui a não utilização de iniciais, números de registros em instituições ou outras formas de cadastros.

A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. Como o pesquisador principal será responsável por essa etapa, ele estará obrigatoriamente comprometido em não fazer cópia ou registro por escrito sobre qualquer parte da “Informação Confidencial” e garantir que esta esteja protegida de forma adequada contra revelação, cópia, registro ou uso indevido e não autorizado. O pesquisador sempre devolverá todos os documentos relacionados à “Informação Confidencial”, incluindo cópias; não disponibilizará o material biológico a terceiros sem o consentimento por escrito do Comitê de ética em Pesquisa; não reclamará a qualquer tempo posse de direito relativo ao uso de produtos ou processos derivados da “Informação Confidencial”.

Se depois de consentir em sua participação o Sr. (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Em relação a despesas, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames, o grupo de pesquisa do pesquisador principal garante ao participante o custeio decorrentes da participação no estudo. Para esta pesquisa, não se faz necessária a participação de acompanhante para coletas, pois a pesquisa se dará em pacientes saudáveis.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. O pesquisador responsável se responsabiliza em dar acesso aos resultados de exames e de tratamento ao médico do paciente e ou ao próprio paciente sempre que solicitado e/ou indicado. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua Domingos Veríssimo, 636 - Centro - Cruz Alta - RS, pelo telefone (55) (3322-6463), ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UNICRUZ, no Prédio 08 - Sala 103 do Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6 - Parada Benito - Cruz Alta - RS, telefone (55) 3321-1618.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Efeito da *Campomanesia xanthocarpa* na agregação plaquetária: comparação e sinergismo com o ácido acetilsalicílico”, como sujeito. Fui

suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” Efeito da *Campomanesia xanthocarpa* na agregação plaquetária: comparação e sinergismo com o ácido acetilsalicílico”. Eu discuti com o Prof. Dr. Paulo Ricardo Nazário Viecili sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas, as quais serão ressarcidas se houver, e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar se o estudo afetar minha integridade e saúde. A assistência integral e gratuita será dada pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa, garantida pelo pesquisador em caso de danos decorrentes direta ou indiretamente de sua participação no estudo. A assistência integral gratuita ao participante da pesquisa fica garantida pelo pesquisador somente em caso de danos decorrentes de sua participação no estudo. As voluntárias em tratamento no estudo que engravidarem e vierem a abortar espontaneamente receberão toda a assistência necessária, inclusive psicológica. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste Serviço. O participante da pesquisa e o pesquisador devem rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apondo sua assinatura na última página do presente Termo.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Cruz Alta _____, de _____ de 20____

Pesquisador responsável

