

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTO E NUTRIÇÃO**

MARIA EDUARDA DIAS VEDOVETO

**ESTUDO DO EFEITO ANTIPLAQUETÁRIO DE UM ANÁLOGO DA GRANDISINA**

CAMPO GRANDE - MS

2024

MARIA EDUARDA DIAS VEDOVETO

**ESTUDO DO EFEITO ANTIPLAQUETÁRIO DE UM ANÁLOGO DA GRANDISINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

CAMPO GRANDE - MS

2024

# **ESTUDO DO EFEITO ANTIPLAQUETÁRIO DE UM ANÁLOGO DA GRANDISINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

Campo Grande, 25 de Novembro de 2024

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto – UFMS – Orientador

---

Prof. Dr. Davi Campos La Gatta – UFMS

---

Profa. Dra. Egidi Mayara Firmino Silva – UFMS

## **SUPLENTE DA BANCA**

---

Msc. Denise Caroline Luiz Soares Basílio – UFMS

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem Sua benção e proteção, eu não teria chegado aonde cheguei e não teria tido força para aguentar 5 anos longe da família por um propósito maior, que é a minha formação.

Agradeço meus pais, Rosana e Márcio, por terem me dado todo suporte, cuidado, motivação, orações e amor, por estarem sempre me mostrando que o caminho para o sucesso é a educação e por me apoiarem e incentivarem em todas as minhas escolhas. Também sou grata à minha segunda mãe, tia Rose, e à minha prima/irmã Isis e ao meu tio Chico, que estiveram sempre ao meu lado, me ajudando sempre que possível e dando todo amparo emocional.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto, que aceitou me orientar e esteve sempre disposto a me ajudar quando necessário. Além disso, tenho muito que agradecer também a todos que fazem parte do Laboratório de Hematologia e Biologia Redox, mas em especial, a mestre e doutoranda Isabelly Teixeira Espinoça, que estava sempre disponível para tirar minhas dúvidas e me ajudar, e à IC Anna Julia Papa de Araújo por ter me ajudado nesse processo e deixado toda a caminhada mais leve nos momentos em que estávamos juntas fazendo os experimentos. Agradeço o Laboratório de Química Farmacêutica (LASQUIM), coordenado pelo Prof. Dr. Adriano Baroni, por ter sintetizado e disponibilizado o composto para estudo. Agradeço também o Prof. Dr. Saulo por ter sido a pessoa que mais colaborou com doações de sangue, sendo peça fundamental para que eu tivesse resultados.

Gostaria também de deixar registrada minha gratidão às minhas amigas Larissa, Livia, Vitória Vieira, Daniele, Fernanda, Vitória dos Santos e Juliana, e meus amigos Júlio, João Vitor, Jose Vitor, Ralson, Rafael, Rudimar, Cauê, Luli e José Lucas por terem deixado essa caminhada mais tranquila e leve, me ajudando, apoiando e incentivando a continuar nos momentos difíceis dessa jornada.

E por fim, mas não menos importante, uma pessoa especial que entrou na minha vida recentemente, pegando o final dessa trajetória, meu namorado Victor Bojikian, que esteve ao meu lado, me dando forças, falando palavras reconfortantes, me abraçando nos momentos que o cansaço mental e físico batia e me ajudando a fazer tudo para que saísse da melhor maneira possível.

## RESUMO

A hemostasia é um processo fisiológico que envolve um conjunto de fenômenos químicos e mecânicos adaptativos para que haja o bloqueio de lesões vasculares através da liberação de substâncias com atividades pró e anticoagulantes. Quando há o desequilíbrio da hemostasia pode ocorrer a formação de trombos. Com a obstrução das artérias e veias, complicações como Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), Acidente Vascular Cerebral (AVC) e tromboembolismo pulmonar (TEP) podem aparecer. Diante das dificuldades de tratamento, visto que há vários efeitos adversos, é necessário o desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos. Este estudo tem como objetivo investigar a ação antiplaquetária de um análogo isoxazólico (AGDZ 6), em modelo experimental *in vitro*. A análise preditiva de biodisponibilidade oral (*in silico*) do AGDZ 6 foi avaliada utilizando o software SwissADME<sup>®</sup> e a toxicidade foi avaliada por meio do Osiris<sup>®</sup> Property Explorer. A toxicidade *in vitro* do AGDZ 6 foi realizada pelo ensaio de exclusão de azul de trypan em plaquetas. O estudo da agregação plaquetária foi realizado por turbidimetria em diferentes concentrações (3,125 - 100 µM) de AGDZ 6 utilizando ADP e adrenalina como agentes agregantes. A medida do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada por fluorescência. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), juntamente com o Teste de Tukey-Kramer, com significância menor que 0,05. As análises *in silico* mostraram que o AGDZ 6 possui alta absorção gastrointestinal, baixo risco em relação à mutagenicidade, tumorigenicidade e irritabilidade. Além disso, o AGDZ 6 se mostrou pouco tóxico uma vez que diminuiu discretamente viabilidade das plaquetas. A inibição da agregação plaquetária foi significativa, apresentando em média 33,33% com ADP e 53,16% com epinefrina nas diferentes concentrações testadas. O AGDZ 6 diminuiu a ativação plaquetária uma vez que inibiu cerca de 25,85% a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, o AGDZ 6 apresentou potencial ação antiplaquetária, visto que foi capaz de diminuir a ativação e agregação plaquetária.

**Palavras-chaves:** Hemostasia, trombose, plaquetas, antiplaquetário, análogo

## ABSTRACT

Hemostasis is a physiological process involving a series of adaptive chemical and mechanical phenomena to block vascular injuries through the release of substances with pro- and anticoagulant activities. When hemostasis is imbalanced, thrombus formation may occur. The obstruction of arteries and veins can lead to complications such as Acute Myocardial Infarction (AMI), Stroke, and Pulmonary Thromboembolism (PTE). Given the challenges in treatment, especially considering various adverse effects, the development of new antithrombotic drugs is necessary. This study aims to investigate the antiplatelet action of an isoxazolic analog (AGDZ 6) in an in vitro experimental model. Predictive analysis of oral bioavailability (in silico) of AGDZ 6 was performed using SwissADME® software, while toxicity was assessed with the Osiris® Property Explorer. The in vitro toxicity of AGDZ 6 was evaluated through a trypan blue exclusion assay on platelets. Platelet aggregation studies were conducted via turbidimetry at different concentrations (3.125–100 µM) of AGDZ 6, using ADP and adrenaline as aggregation agents. The measurement of reactive oxygen species (ROS) content was performed using fluorescence. Statistical analysis was conducted through variance analysis (ANOVA) and the Tukey-Kramer test, with significance set at  $p < 0.05$ . In silico analyses showed that AGDZ 6 has high gastrointestinal absorption and a low risk of mutagenicity, tumorigenicity, and irritability. Additionally, AGDZ 6 was found to be minimally toxic, as it slightly reduced platelet viability. Platelet aggregation inhibition was significant, averaging 33.33% with ADP and 53.16% with epinephrine at the tested concentrations. AGDZ 6 reduced platelet activation by inhibiting approximately 25.85% of reactive oxygen species (ROS) production. Therefore, AGDZ 6 demonstrated potential antiplatelet activity, as it effectively reduced platelet activation and aggregation.

**Keywords:** Hemostasis, thrombosis, platelets, antiplatelet, analogue

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Estrutura privilegiada de neolignanas tetrahidrofurânicas (Veraguensina 1, Grandisina 2 e Machilina G 3) com potencial antileishmania

**Figura 2** - Estrutura química do análogo isoxazólico derivado de neolignanas tetrahidrofurânicas 6 (AGDZ 6).

**Figura 3** - Hemostasia Primária

**Figura 4** - Ativação dos Fatores de Coagulação e Formação da Fibrina

**Figura 5** - Reabsorção do tampão hemostático

**Figura 6** - Efeito tóxico do AGDZ 6 sobre as plaquetas humanas

**Figura 7** - Efeito do AGDZ 6 sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP)

**Figura 8** - Efeito do AGDZ 6 sobre a agregação plaquetária induzida pela epinefrina

**Figura 9** - Efeito do AGDZ 6 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Parâmetros teóricos de biodisponibilidade oral do AGDZ 6.

**Tabela 2** - Parâmetros de toxicidade teórica do AGDZ 6 avaliado pelo software Osiris®  
Property Explorer

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AGDZ	Análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas
AGDZ 6	Análogo isoxazólico derivado de neolignana tetrahidrofurânica 6
AVC	Acidente vascular cerebral
AVK	antagonistas da vitamina K
CEP-SH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-SH)
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio iônico
DCFH-DA	2',7'-Diclorofluoresceína diacetato
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EPI	Epinefrina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FACFAN	Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
FT	Fator tecidual
FVII	Fator VII
FvW	Fator de von Willebrand
GP	Glicoproteína
GPIb	Glicoproteína Ib
GPIb $\alpha$	Glicoproteína Ib $\alpha$
GPIIb/IIIa	Complexo de glicoproteínas IIb e IIIa
GPIV	Glicoproteína IV
5-HT	5-hidroxitriptamina
IAM	Infarto agudo do miocárdio
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	Peso molecular
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
SIB	Instituto Suíço de Bioinformática

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEP Tromboembolismo pulmonar

TVP Trombose venosa profunda

TPSA - área de superfície polar

TXA1 Tromboxano A1

TXA2 Tromboxano A2

UFMS Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
2.1 HEMOSTASIA	15
2.1.1 Hemostasia Primária	15
2.1.2 Hemostasia Secundária	17
2.1.3 Fibrinólise	18
<b>2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)</b>	<b>19</b>
<b>2.3 TROMBOSE VENOSA PROFUNDA E TRATAMENTO</b>	<b>20</b>
<b>2.4 COMPOSTOS SINTÉTICOS</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3.2.1 Analisar a toxicidade do AGDZ 6, avaliando mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos negativos sobre a reprodução e irritabilidade <i>in silico</i>	22
3.2.2 Analisar a biodisponibilidade oral <i>in silico</i>	22
3.2.3 Avaliar o efeito do AGDZ 6 sobre a viabilidade das plaquetas	22
3.2.4 Avaliar o efeito do AGDZ sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP e pela epinefrina	22
3.2.5 Avaliar o efeito do AGDZ 6 sobre a ativação plaquetária: Produção de espécies reativa de oxigênio (EROs)	22
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	23
4.2 SÍNTESE DO ANÁLOGO ISOXAZÓLICO (6) DERIVADO DA GRANDISINA (AGDZ 6)	23
4.3 ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DO AGDZ 6	23

4.4 COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS PLAQUETAS	24
4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE COM AZUL DE TRYPAN	24
4.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA	25
4.6.1 Agregação plaquetária	25
4.7 ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA	25
4.7.1 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	25
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
5.1 ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS AGDZ 6	27
5.2 EFEITO DO AGDZ 6 SOBRE A VIABILIDADE DE PLAQUETAS	28
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE DO AGDZ 6	28
5.4 EFEITO DO AGDZ 6 NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) POR PLAQUETAS	30
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Para que o sistema vascular seja mantido em condições fisiológicas normais, o endotélio vascular regula a hemostasia, processo que promove alterações funcionais adaptativas, através da manutenção do fluxo sanguíneo laminar e equilíbrio entre coagulação e hemorragia, além do controle de processos inflamatórios por meio da inibição da migração celular por mediadores inflamatórios. Assim, ocorre a liberação, por meio do endotélio, de substâncias com atividades pró e anticoagulantes para propiciar a adesão entre as moléculas (GROSS; AIRD, 2000). Porém, alguns fatores, sejam eles genéticos ou por condições adquiridas, podem fazer com que haja perda da ação reguladora do endotélio, ocasionando um desequilíbrio na hemostasia vascular, o que resulta no aumento da vasoconstrição, formação de trombos e acúmulo de células na parede dos vasos (GANZ; VITA, 2003).

A trombose é uma condição patológica caracterizada pela formação de coágulos nas artérias e vasos sanguíneos, impedindo a fluidez sanguínea. O aumento da coagulação tem como principal causa o que se denomina tríade de Virchow - estase venosa, hipercoagulabilidade e a lesão endotelial - e pode estar relacionada a fatores genéticos, como fator V de Leiden, hiper-homocisteinemia, mutação 20210A do gene da protrombina, antitrombina III, e as deficiências das proteínas C e S, ou adquiridos, como anticorpos antifosfolípidios, neoplasias, gestação, cirurgias, traumas e o uso dos anticoncepcionais (GODOY, 2009).

A Trombose pode ser dividida em arterial ou venosa. A obstrução que ocorre nas artérias pode trazer complicações para o coração, como Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), e cérebro, como Acidente Vascular Cerebral (AVC), já a obstrução dos vasos sanguíneos pode trazer riscos ao pulmão, causando tromboembolismo pulmonar (TEP) (HOSPITAL MOINHO DE VENTO, 2021.).

A terceira causa de morte associada às DCV é a trombose venosa, que inclui a trombose venosa profunda (TVP) (MACKMAN, 2008; OMS, 2021), que tem incidência na população geral de 5 a cada 10.000 habitantes por ano (FOWKES et.al, 2003) e que leva a embolia pulmonar (EP).

Diante do desafio do tratamento do TVP, visto que os fármacos anticoagulantes presentes no mercado, como antagonistas da vitamina K (AVK), possuem restrições em relação à farmacodinâmica e farmacocinética (SILVESTRE et al, 2012), causando efeitos adversos como: hemorragia, osteoporose por uso a longo prazo, necrose de

pele e hipersensibilidade (HAMERSCHLAK; ROSENFELD, 1996), é necessário o desenvolvimento de novos fármacos através da síntese de compostos orgânicos.

As neolignanas tetrahydrofurânicas, como Veraguensina (1), Grandisina (2) e Machilina G (3), ilustradas na Figura 1, possuem várias atividades biológicas, entre elas anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, antiviral, antitumoral, imunossupressora, anti-hepatotóxica, relaxante muscular, cercaricida, anticonvulsivante, antiespasmódica, antialérgica, entre outras.

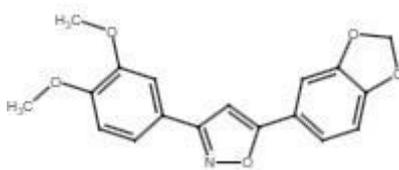
**Figura 1.** Estrutura privilegiada de neolignanas tetrahydrofurânicas (Veraguensina 1, Grandisina 2 e Machilina G 3).



**Fonte:** A autora

Assim, com as limitações existentes com os medicamentos antitrombóticos presentes no mercado, faz-se necessário o estudo e desenvolvimento de novos medicamentos com ação antitrombótica, sendo os derivados isoxazólicos de neolignanas compostos com grande potencial terapêutico.

**Figura 2.** Estrutura química do análogo isoxazólico derivado de neolignanas tetrahydrofurânicas 6 (AGDZ 6).



**Fonte:** A autora

Sendo assim, este estudo visa avaliar o efeito antiplaquetário do análogo isoxazólicos 6 (AGDZ 6).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é o processo fisiológico complexo que tem como função manter a fluidez sanguínea e a integridade vascular, formando um tampão hemostático através da agregação de plaquetas e ativação dos fatores da cascata de coagulação, que levam à formação de coágulos de fibrina, após uma lesão vascular permitindo o equilíbrio do sistema circulatório (BERGER et al, 2014; RODRIGUES et al, 2012). A hemostasia é dividida em 3 etapas: hemostasia primária, hemostasia secundária ou coagulação e hemostasia terciária ou fibrinólise, porém, todas ocorrem concomitantemente (TAKAHIRA, 2003).

#### 2.1.1. Hemostasia Primária

A hemostasia primária compreende a primeira etapa de formação dos trombos e possui quatro constituintes: plaquetas, endotélio, FvW (Fator de von Willebrand) e micropartículas (Figura 2.B). Além disso, ela é dividida em vasoconstrição, adesão, ativação e agregação plaquetária. (RODRIGUES et al, 2012).

Logo após a lesão, ocorre interação entre as plaquetas e o endotélio para interromper o fluxo sanguíneo (GÓMEZ, 2017). Assim, ocorre a vasoconstrição, etapa responsável por reduzir o fluxo sanguíneo do local e retardar a perda sanguínea extravascular (Figura 2.A). Esse processo ocorre através das substâncias vasoconstritoras endotelina 1, serotonina e TXA2, que agem nas células do músculo liso vascular, visto que, com a lesão vascular, ocorre a perda da barreira física e metabólica decorrente do endotélio (RODRIGUES et al, 2012).

As plaquetas são importantes na formação dos tampões e possuem quatro funções: ativação, adesão, agregação e secreção. Com a ativação plaquetária, é possível que ocorra aumento da quantidade de plaquetas e ativação de fatores de coagulação, que levam a formação de fibrina, essencial na hemostasia para restaurar os níveis de fibrinogênio e protrombina (ZAIDI; GREEN, 2019; TANAKA, BOLLIGER, 2014).

Com a lesão vascular, a adesão da plaqueta ao vaso lesado ocorre pela interação do GPIIb/IIIa, receptor de plaqueta, com o FvW. Após essa adesão, ocorre a

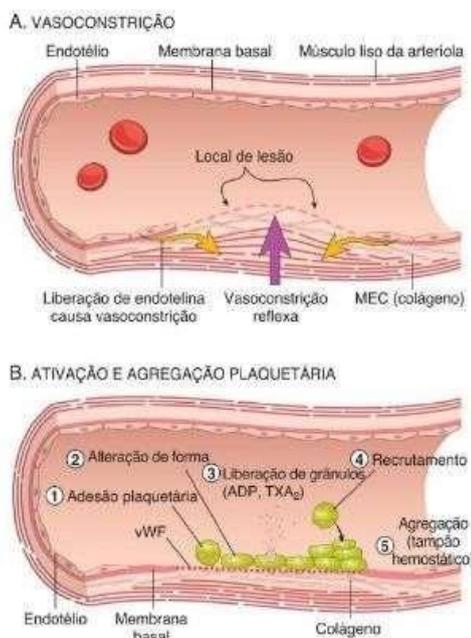
ativação de vias intracelulares por meio de agonistas da ativação plaquetária, como ADP, serotonina e colágeno. Com a ativação das plaquetas, outros receptores ficam expostos para se ligarem ao colágeno, FvW e fibronectina, fazendo com que haja maior adesão plaquetária no endotélio (RODRIGUES et al, 2012; ZAIDI; GREEN, 2019).

Em seguida, as plaquetas sofrem alterações em sua estrutura, devido a ativação do sistema contrátil actina-miosina decorrentes do aumento da concentração intracelular de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), para aumentar a adesão em outras superfícies. Nesse processo, o FvW é a principal glicoproteína responsável por promover a adesão plaquetária (RODRIGUES et al, 2012; ZAIDI; GREEN, 2019).

Após a adesão, a trombina, ADP e TXA1 ativam GPIIb/IIIa, receptores da membrana plaquetária, que são potentes intensificadores da agregação plaquetária (ZAIDI; GREEN, 2019). O tampão hemostático primário, processo transitório que impede provisoriamente o sangramento, é formado a partir desse processo. Assim, ocorre uma agregação plaquetária irreversível por meio de uma segunda ligação do colágeno e FvW às integrinas plaquetárias, seguindo da ligação dos receptores plaquetários GPIIb-III $\alpha$  e integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ao fibrinogênio solúvel (RODRIGUES et al, 2012).

Por fim, ocorre a secreção plaquetária, cujas plaquetas liberam substâncias pró-coagulantes responsáveis por uma nova fase de agregação após a ativação plaquetária inicial (ZAIDI; GREEN, 2019). Os agentes pró-agregantes, como ADP, tromboxana A2 (TXA2) e serotonina (5-HT), recrutam e agregam outras plaquetas circulantes, formando um tampão celular (BERGER et al, 2014).

**Figura 3.** Hemostasia Primária.



**Fonte:** KUMAR et al., 2018.

### 2.1.2 Hemostasia Secundária

Na hemostasia secundária ocorrem processos enzimáticos que formarão um coágulo de fibrina, reforçando o tampão plaquetário formado inicialmente, desenvolvendo um coágulo definitivo, conforme demonstra a Figura 3 (GÓMEZ, 2017). Na cascata de coagulação, modelo proposto por Davie e Ratnoff e MacFarlane em 1964, a ativação dos fatores de I a XIII é dividida em duas vias: intrínseca e extrínseca (SILVA; MELO, 2016). Porém, esse modelo possui limitações em relação à explicação dos fenômenos da hemostasia in vivo (FERREIRA et al, 2010).

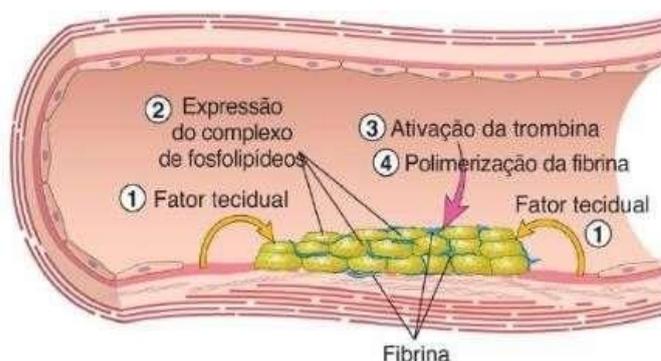
Sendo assim, um novo modelo foi proposto, em que leva em consideração a interação das proteínas plasmáticas com a superfície celular (BERGER et al, 2014). Esse modelo é dividido em três etapas: iniciação, amplificação e propagação, que ocorrem na plaqueta ativada e na superfície da célula portadora do fator tecidual (RODRIGUES et al).

A etapa de iniciação ocorre através da exposição do fator tecidual (FT) por meio de uma lesão vascular. Assim, o FT forma um complexo com o Fator VII (FVII), esse complexo ativa o fator X e fator IX, tornando-os fator Xa e fator IXa. O fator Xa, juntamente com o fator V converte protrombina em trombina, que participa da etapa de amplificação (CAGNOLATI et al, 2017).

A trombina formada no processo de iniciação amplifica o processo de coagulação por meio da maior ativação de plaquetas, alterando a permeabilidade de membrana das plaquetas, tendo maior entrada de íons cálcio e saída de substâncias quimiotáticas, resultando na atração de fatores de coagulação. Além disso, ativa os cofatores FV e FVIII na superfície das plaquetas ativadas e desfaz o complexo FvW/FVIII, liberando o FvW para realizar a agregação plaquetária no local da lesão (FERREIRA et al, 2010).

Para finalizar a hemostasia secundária, ocorre o processo de propagação, em que realiza a atração de mais plaquetas para o local lesionado. Sendo assim, o FXa se liga ao FVa, complexo que converte protrombina em trombina, proteína responsável por acoplar o fibrinogênio em monômeros de fibrina que fortalecem o tampão plaquetário inicial, tornando-o estável (FERREIRA et al, 2010).

**Figura 4.** Ativação dos Fatores de Coagulação e Formação da Fibrina.

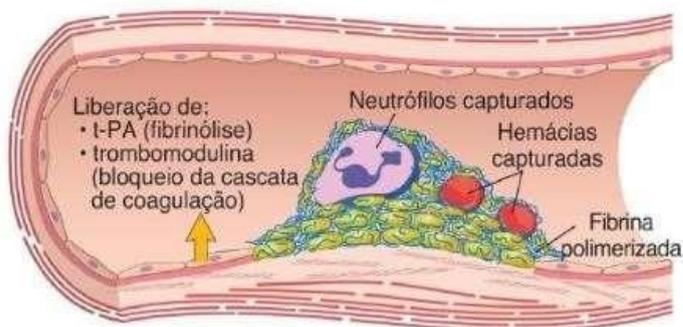


**Fonte:** KUMAR et al., 2018

### 2.1.3 Fibrinólise

A fibrinólise é responsável por permitir que o sangue volte a fluir normalmente dentro do vaso sanguíneo através da degradação de fibrina formada em excesso no processo de coagulação por meio da plasmina, conforme a Figura 4 (CAGNOLATI et al, 2017).

**Figura 5.** Reabsorção do tampão hemostático.



**Fonte:** KUMAR et al., 2018.

## 2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

A produção de energia para o metabolismo celular necessita de oxigênio, assim como a oxidação de compostos orgânicos, porém, cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido é reduzido, gerando substâncias com grande potencial de serem reativas, designadas espécies reativas do oxigênio (EROs). Estas podem causar injúria tecidual e, em altas concentrações, danificar organelas celulares (SILVA e GONÇALVES, 2010)

A cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (CTE) é a principal forma endógena de produção de EROs e, quando essa produção está aumentada pode ocorrer dano irreversível ao DNA mitocondrial e nuclear, tendo como consequência a morte das células e disfunções da mitocôndria, dentre elas a transição da permeabilidade mitocondrial (MPT), que antecede a morte celular e é a permeabilização não seletiva da membrana interna. (SIMÕES, 2003)

As EROS são importantes no processo de fagocitose, assim como as espécies reativas de nitrogênio, sendo importantes no metabolismo humano para eliminar agentes agressores (VASCONCELOS et al, 2007).

O desequilíbrio entre a produção das EROS e sua eliminação, tem o estresse oxidativo, causando danos (SILVA e JASIULIONIS, 2014). Assim, para controlar e neutralizar os danos causados pelas EROs, tem os efeitos antioxidantes das células, realizados por grupos enzimáticos, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, ou não enzimáticos, como glutathione, vitaminas E, C, A e carotenóides (Tuñón e Jiménez, 2002).

O estresse oxidativo ocasionado pelo desequilíbrio de EROS leva a vários distúrbios através da mudança na ativação plaquetária, podendo ser a toxicidade, por aumento da produção de EROS, ocasionando sangramento e trombocitopenia, ou hiperativação, por diminuição da produção de EROS, levando à formação de trombos (Masselli et al., 2020). Sendo assim, as EROS são importantes focos terapêuticos em pesquisas envolvendo hiperativação plaquetária (Basilio et al., 2024; Espinoça et al., 2024).

### 2.3 TROMBOSE VENOSA PROFUNDA E TRATAMENTO

A trombose venosa profunda (TVP) é caracterizada pela hipercoagulação associada com estase venosa local e obstrução dos vasos sanguíneos. Essa condição ocorre principalmente nos membros inferiores e tem como consequência a embolia pulmonar (EP), visto que pode ocorrer o desprendimento dos trombos com formação de êmbolos que obstruem as artérias pulmonares (CHARLO et al, 2020; ALBUQUERQUE; VIDAL, 1996).

A ocorrência anual de TVP no Brasil é de 0,6 casos a cada 1.000 habitantes, já na população geral é de 5 casos a cada 10.000 indivíduos (CHARLO et al, 2020). Muitos são os fatores de risco da TVP, podendo ser gerais, como idade, sexo e dias de internação, uso de medicamentos, como anticoncepcionais, reposição hormonal e corticosteróides, além de eventos clínicos e cirúrgicos (GARCIA et al, 2005). As mortes súbitas ocorridas no pós-operatório têm a TVP como principal causa. Além disso, é a principal causa de morbidade e mortalidade nas fraturas do colo do fêmur (ALBUQUERQUE; VIDAL, 1996)

Apenas 20% dos pacientes com TVP apresentam sintomatologia, sendo os mais comuns: dores intensas na região comprometida, com edema difuso, cianose local e impotência funcional (ALBUQUERQUE; VIDAL, 1996).

A TVP ocorre com maior incidência nos membros inferiores e pode ser classificada como proximal ou distal. A TVP proximal afeta as veias poplítea, femoral ou ilíaca sendo a causa mais comum de mortalidade, quando comparada com a TVP distal, visto que, leva à formação da TEP fatal e é associada a doenças crônicas severas. Já a TVP distal afeta as veias tibiais ou peronias e está associada a eventos temporários, como processos cirúrgicos e imobilizações (ELISEU, 2022).

O tratamento dessa patologia é realizado com medicamentos antitrombóticos, como anticoagulante e antiplaquetários. Entre os anticoagulantes, o principal fármaco é a heparina, que é um inibidor natural da coagulação através da ativação do cofator antitrombina III, que bloqueia o fator X ativado, interrompendo a coagulação (ALBUQUERQUE; VIDAL, 1996). Porém, a heparina possui vários efeitos adversos, como hemorragias, osteoporose, eosinofilia, reações cutâneas, alopecia, alteração dos testes de função hepática, hipercalemia ocasional e, principalmente, trombocitopenia (LONGHI, 2001). Já os principais antiplaquetários são: aspirina (ácido acetilsalicílico), clopidogrel e ticlopidina, que atuam inibindo a ativação plaquetária (CHAVES et al, 2010).

## 2.4 COMPOSTOS SINTÉTICOS

Os fármacos antitrombóticos, tanto anticoagulantes quanto antiplaquetários, possuem diversos efeitos colaterais, como a hemorragia, fazendo com que eles tenham limitações durante o tratamento de eventos tromboembólicos (AFONSO, 2016). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novos medicamentos que apresentam ação anticoagulante e/ou antiplaquetária.

Historicamente, os produtos naturais foram as fontes iniciais de antitrombóticos, sendo assim, há uma maior busca de substâncias de origem vegetal para atuar no processo homeostático e prevenir eventos trombóticos (CHAVES et al, 2010).

Sendo assim, pode-se realizar a síntese de novos compostos através de metabólitos secundários, como a neolignana, que são derivadas da condensação oxidativa de alilfenóis e propenilfenóis entre si ou cruzada (AVENIENTE, 2009). As neolignanas possuem atividades antitumoral, antileishmaníacas, antimaláricas e anti-inflamatórias (PEREIRA et al, 2011).

Através do bioisosterismo, técnica de química medicinal para o planejamento racional de novos medicamentos, análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas, como Veraguensina, Grandisina e Machilina G, podem ser sintetizados para estudos com ação antiplaquetária e anticoagulante.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de um análogo isoxazólico (AGDZ 6) da grandisina sobre a ativação e agregação plaquetária.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar a toxicidade do AGDZ 6, avaliando mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos negativos sobre a reprodução e irritabilidade *in silico*;

3.2.2 Analisar a biodisponibilidade oral *in silico*;

3.2.3 Avaliar o efeito do AGDZ 6 sobre a viabilidade das plaquetas;

3.2.4 Avaliar o efeito do AGDZ 6 sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP e pela epinefrina;

3.2.5 Avaliar o efeito do AGDZ 6 sobre a ativação plaquetária.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-SH) vinculado à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob nº de parecer 5.835.526 (CAAE: 66042722.8.0000.0021 — Anexo A).

### 4.2 SÍNTESE DO ANÁLOGO ISOXAZÓLICO (6) DERIVADO DA GRANDISINA (AGDZ 6)

Por meio de reações de cicloadição entre acetilenos terminais e clorooximas com padrões de substituição encontrados nas neolignananas 1-3 foi realizada a síntese do análogo isoxasólico 6 (AGDZ6) da grandisina.

A síntese do análogo da grandisina AGDZ-6 foi realizada em colaboração com o Laboratório de Química Farmacêutica coordenado pelo Prof. Dr. Adriano César de Moraes Baroni.

### 4.3 ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DO AGDZ 6

Com a plataforma online desenvolvida pelo Instituto Suíço de Bioinformática (SIB), SwissADME<sup>®</sup>, foi avaliada a biodisponibilidade oral do AGDZ 6. Essa plataforma faz uma avaliação teórica da farmacocinética, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, além de avaliar a similaridade com medicamentos já existentes e a compatibilidade química medicinal. O composto AGDZ 6 foi avaliado segundo os cinco critérios de Lipinski, os quais são: mLogP, peso molecular (PM), número de aceptores de ligação de hidrogênio (átomos de N e O), número de doadores de ligação de hidrogênio (radicais NH e OH) e número de ligações rotacionáveis e área de superfície polar (TPSA). Portanto, para que haja boa absorção, o composto precisa apresentar Log P inferior a 5 (ou mLog P inferior a 4,15); peso molecular menor que 500 g/mol; menos de dez receptores de ligação de hidrogênio; e menos de cinco doadores de hidrogênio. (Lipinski et al., 1997; Veber et al., 2002).

Os ensaios de toxicidade levaram em consideração a mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução. Para a avaliação foi utilizado o software Osiris® Property Explorer, um software que analisa através da escala de baixo, médio e alto risco.

#### 4.4 COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS PLAQUETAS

A coleta das amostras foi realizada de maneira voluntária por pacientes saudáveis, sem histórico de trombose ou hemorragias. Foi coletado 5 mL de amostra por profissionais autorizados e capacitados do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (LAC/FACFAN/UFMS).

Após a coleta por punção venosa, utilizando tubos contendo citrato de sódio (3,8%) (9:1; m/v), o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 900 g. O número de plaquetas foi ajustado entre 200 e 250 mil plaquetas/mm<sup>3</sup> em solução fisiológica, obtendo o plasma rico em plaquetas (PRP).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE COM AZUL DE TRYPAN

A viabilidade das plaquetas foi avaliada utilizando o teste de exclusão com azul de Trypan. Para a avaliação foram incubados 400 µL do pool de PRP com as concentrações de AGDZ 6 (100, 50, 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µL) e veículo (DMSO 0,6%, controle negativo-NC) por 5 minutos. Foi utilizado para o controle positivo Triton X100 1% (v/v). Após as incubações, 50 µL do PRP foi tratado nas diferentes concentrações e controles, foram misturados com azul de Trypan a 0,04% e 20 µL dessa mistura foi transferida para uma câmara de Neubauer para contagem de plaquetas totais e não viáveis. Foram utilizados como controle negativo (NC) Para a determinação da viabilidade das plaquetas foi utilizada a Equação 1 e o resultado foi expresso em porcentagem (%) média de plaquetas viáveis e desvio padrão.

$$\text{Equação 1. Plaquetas viáveis (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ total de plaquetas viáveis}}{n^{\circ} \text{ total de plaquetas}} \times 100$$

## 4.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.6.1 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi analisada por turbidimetria utilizando um aparelho agregômetro semiautomatizado (EasyAgreg, Qualitem®). Foram utilizados 400 µL do plasma rico em plaquetas (PRP) para a homogeneização sob agitação de 180 g a 37°C em uma curveta.

A plaquetas foram pré-incubadas com o AGDZ 6 nas diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µM) e veículo (DMSO 0,6%, controle negativo - NC) por 5 minutos a 37°C. Após esse período, foram adicionados os agentes agregantes adenosina difosfato (ADP) e epinefrina. Como controle positivo (CP) foi utilizado ticlopidina 10 µM (WEBER et al, 2022). Como branco foi utilizado o plasma pobre em plaquetas (PPP). Foram realizadas triplicatas de todos os testes.

## 4.7 ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

### 4.7.1 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A análise da ativação plaquetária foi realizada através da medida da produção de EROs e determinada por intensidade de fluorescência. Foram incubados 200 µL de PRP ( $2,5 \times 10^8$  células/µL) com 2,5 µg de DMSO 0,6% ou 2,5 µg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizados como controle negativo (NC) e controle positivo (CP), respectivamente, por 5 minutos em uma microplaca de 96 poços. Além disso, também foram incubados com AGDZ-6 nas concentrações 3,125 a 100 µM. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de DCFH-DA (10 µM) aos poços e incubados por 30 minutos. Após a incubação, foi medida a intensidade de fluorescência a 485 nm para excitação e 530 nm para emissão utilizando um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific®, Vantaa, Finlândia). Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), que compara as variâncias entre as médias de grupos diferentes, juntamente com o Teste de Tukey-Kramer, quando necessário, com significância mínima de  $p < 0,05$ . O software utilizado será o GraphPad Pim versão 8.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS AGDZ 6

Após ser analisado, o composto AGDZ 6 mostrou-se de acordo com os parâmetros de Lipinski et al (1997) e Veber et al (2002), sendo possível observar que não há violações, solubilidade moderada em água e alta absorção gastrointestinal (Tabela 1).

**Tabela 1** - Parâmetros teóricos de biodisponibilidade oral do AGDZ 6.

Parâmetro	LogP	PM (g/mol)	nº O+N	nº OH + NH	nº rotb	TPSA	nº de violações
<b>Ideal</b>	≤ 5	< 500	≤ 10	≤ 5	< 10	≤ 140	≤ 1
<b>AGDZ 6</b>	3,25	325.32 g/mol	6	0	4	62.95	0
<b>AGDZ 6</b>	Sol.	Solubilidade moderada		AGDZ 6	Abs. GI		Alta

**Nota:** LogP – consenso dos LogP; PM – peso molecular; nº O+N – número de aceptores de ligação de H; nº OH+NH – número doadores de ligação de H; nº rotb – número de ligações rotacionáveis; TPSA – área de superfície polar topológica; nº de violações – número de violações. Sol. – Solubilidade em água. Abs. GI – Absorção gastrointestinal. Fonte: O autor.

Os resultados obtidos com a toxicidade simulada mostraram que o AGDZ 6 possui baixo risco de mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos na reprodução (Tabela 2).

**Tabela 2** - Parâmetros de toxicidade teórica do AGDZ 6 avaliado pelo software Osiris® Property Explorer.

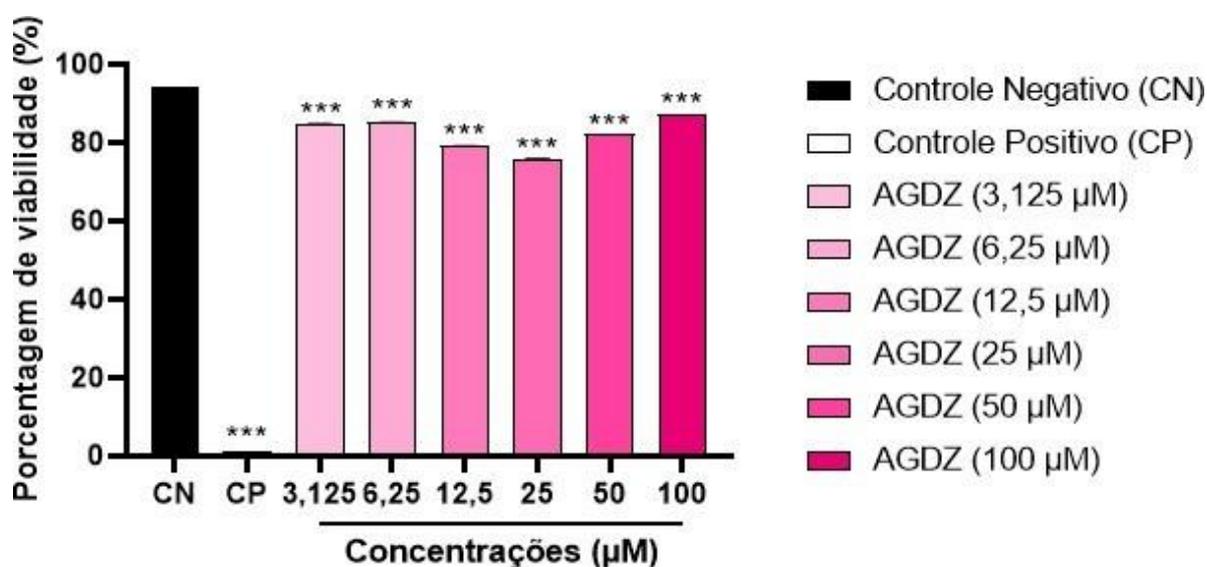
Parâmetro	Mutag.	Tumor.	Irritab.	Reprod.
<b>Ideal</b>	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco
<b>AGDZ 6</b>	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco

**Nota:** Mutag. = mutagenicidade; Tumor. = tumorigenicidade; Irritab. = Irritabilidade; Reprod. = reprodutibilidade. Fonte: O Autor.

## 5.2. EFEITO DO AGDZ 6 SOBRE A VIABILIDADE DE PLAQUETAS

Foi possível observar que o AGDZ 6 diminuiu a viabilidade plaquetária em todas as concentrações analisadas, porém todas as concentrações se mantiveram acima de 80% de plaquetas viáveis, mostrando baixa toxicidade frente às plaquetas humanas. (Figura 6)

**Figura 6** - Efeito tóxico do AGDZ 6 sobre as plaquetas humanas



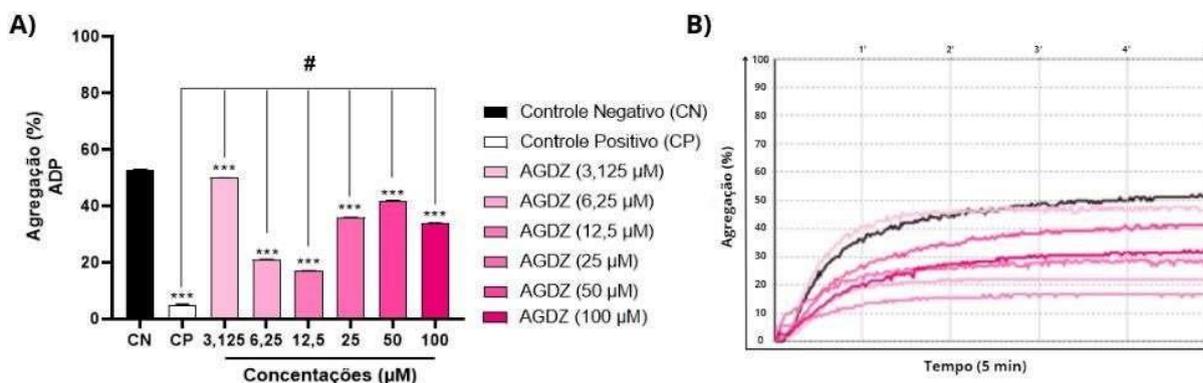
Porcentagem de viabilidade das plaquetas. Tratamento com diferentes concentrações do AGDZ 6 (3,125 a 100 μM) incubada com o PRP, CN = Controle Negativo (DMSO 0,6%) e CP = Controle Positivo (Triton x 100) (\*\*\*) Diferença significativa em relação ao CN (P-valor < 0,001). Fonte: O autor.

## 5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE DO AGDZ 6

Ao realizar os ensaios de efeito antiagregante com o composto AGDZ 6 frente aos agentes agregantes ADP e Epinefrina, foi possível notar que este composto apresentou inibição plaquetária.

Quanto utilizado o ADP, todas as concentrações inibiram a agregação plaquetária em comparação com o controle negativo (CN), conforme as Figuras 7A e 7B, tendo uma média de 33,33% de inibição.

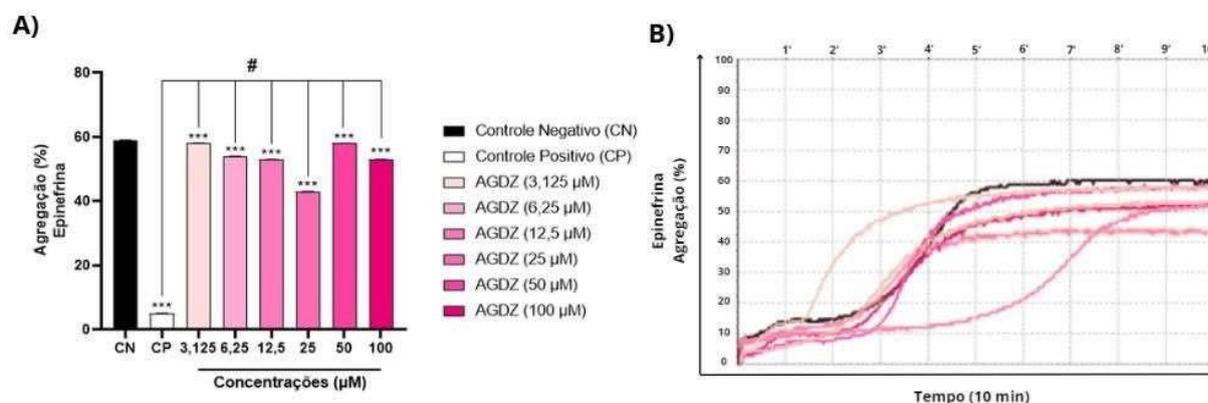
**Figura 7** - Efeito do AGDZ 6 sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP)



Porcentagem de agregação plaquetária com diferentes concentrações do AGDZ 6 (3,125 a 100 µM) induzida por 30 µL de ADP por 5 minutos. CN = controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO 0,6%); CP = controle positivo (Ticlopidina 10 µM). (\*\*\*) Diferença significativa em relação ao CN (P-valor < 0,001) e CP (P-valor < 0,05), respectivamente. Fonte: O autor.

O mesmo ocorreu com a epinefrina, onde observou-se inibição das concentrações em relação ao controle negativo (CN), com uma média inibitória de 53,16%. Além disso, as concentrações 50 µM e 3,125 µM inibiram 58% da agregação plaquetária, conforme demonstrado nas Figuras 8A e 8B.

**Figura 8** - Efeito do AGDZ 6 sobre a agregação plaquetária induzida pela epinefrina

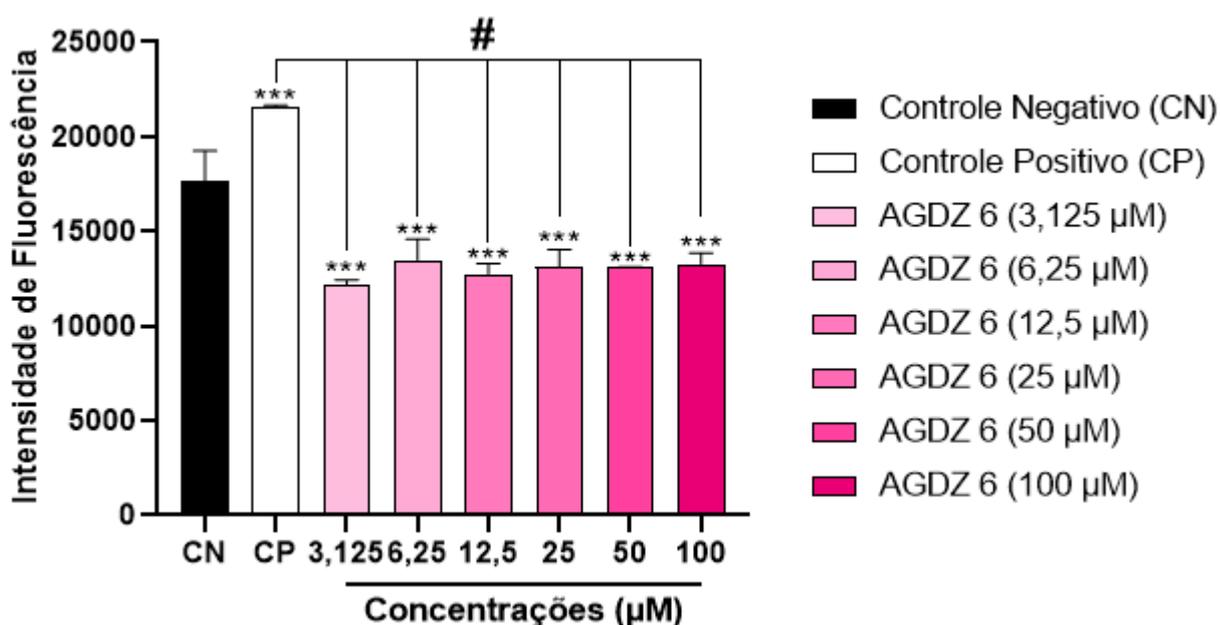


Porcentagem de agregação plaquetária com diferentes concentrações do AGDZ 6 (3,125 - 100 µM) induzida por 1 µL de epinefrina por 10 minutos. CN = controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO 0,6%); CP = controle positivo (Ticlopidina 10 µM). Os testes foram realizados em triplicata. (\*\*\*) e (#) Diferença significativa em relação ao CN (P-valor < 0,001) e CP (P-valor < 0,05), respectivamente. Fonte: O autor.

#### 5.4. EFEITO DO AGDZ 6 NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) POR PLAQUETAS

O composto AGDZ 6, em todas as concentrações, diminuiu de forma significativa a produção de EROS quando comparado ao controle negativo (CN). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) apresentou diminuição média de 25,85% em todas as concentrações testadas (Figura 9).

**Figura 9** - Efeito do AGDZ 6 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)



Conteúdo intraplaquetário de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plaquetas tratadas com AGDZ 6 nas concentrações de 3,125 a 100 µM. CN= controle negativo (DMSO 0,6%), CP = controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (\*\*\*) e (#) Diferença significativa em relação ao CN (P-valor < 0,001) e CP (P-valor<0,05), respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

Para que haja o equilíbrio do sistema circulatório durante uma lesão de vaso, tem-se a hemostasia, que é responsável pela manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue (RODRIGUES et al., 2012). A homeostase depende de três processos, a ativação e amplificação da coagulação, inibição da coagulação e fibrinólise (DÁVILA SINAÍ DEL CARMEN et al., 2019).

Assim, quando ocorre o desequilíbrio da hemostasia, resulta pode resultar em trombose, que é uma doença de caráter multifatorial, que altera os componentes de coagulação do organismo, levando à obstrução parcial ou total dos vasos sanguíneos (FERREIRA e PAPA.; et al 2021).

Para o tratamento da trombose são utilizados os antitrombóticos, que englobam os antiplaquetários, que agem diretamente nas plaquetas, e os anticoagulantes, que agem na cascata de coagulação, porém, são medicamentos com limitações, tendo baixa taxa de absorção, interações medicamentosas e alvos inespecíficos (MEGA; SIMON, 2015). Sendo assim, é necessário novos estudos para desenvolver medicamentos eficazes e seguros. Diante disso, o presente estudo analisou a ação do composto AGDZ 6 sobre a hemostasia.

As plantas medicinais são fontes de medicamentos por terem atividades farmacológicas (PEREIRA et al., 2019; RIBEIRO, 2021). As neolignananas, que fazem parte dos metabólitos secundários das plantas, se destaca em relação à diversas comorbidades, visto que, tem ação bactericida, antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória, antialérgica (ZALESAK, BON, POSPISIL, 2019). Sendo assim, realizou-se o estudo da ação trombótica de um análogo isoxazólico de uma neolignana tetrahidrofurânica para analisar sua ação sobre as plaquetas.

A análise preditiva de biodisponibilidade oral (Tabela 1), foi possível observar de forma teórica que o composto AGDZ 6 possui boa biodisponibilidade oral, visto que não tem violações à Regra dos Cinco de Lipinski, já que possui peso molecular igual a 325.32 g/mol, LogP igual a 3,25, receptores de ligação de hidrogênio igual a 6 e 0 doadores de ligação de hidrogênio, possibilitando o fármaco promissor ter uma boa permeabilidade e absorção.

Além da avaliação da biodisponibilidade oral, foi analisada a toxicidade teórica do composto através do aplicativo OSIRIS, que leva em consideração a estrutura molecular. Sabe-se que nenhum fármaco é totalmente específico, ou seja, nenhum

fármaco é isento 100% de toxicidade, porém, deve-se ter o mínimo de efeito tóxico possível para que haja menor chance de ocorrer efeitos adversos e colaterais. Ao analisar os dados obtidos da Tabela 2, é possível afirmar teoricamente que o composto AGDZ 6 não possui toxicidade e mutagenicidade aparentes, visto que possuem baixo risco nos parâmetros avaliados.

A análise de toxicidade do composto AGDZ 6 sobre as plaquetas humanas, mostrou baixa toxicidade (Figura 6), uma vez que as diferentes concentrações testadas apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao CN, induzindo uma diminuição da viabilidade plaquetária entre 7,13% e 19,32%. Apesar disso, os resultados obtidos não implicam em uma queda considerável na viabilidade plaquetária, visto que, a faixa de referência de indivíduos saudáveis varia entre 150 e 450 x 10<sup>9</sup> plaquetas/mm<sup>3</sup>, o que não implica em significância clínica.

Em relação à inibição da agregação plaquetária, o composto AGDZ 6 diminuiu consideravelmente a agregação tanto com o agonista ADP quanto epinefrina (EPI), porém, houve maior diminuição quando utilizado o ADP, como mostrado nas Figuras 7 e 8. O agonista ADP teve a concentração 12,5 µM como mais eficaz, apresentando uma diminuição de 36% comparado ao CN, já a epinefrina (EPI) foi mais eficiente na concentração 25 µM, com uma diminuição de 16% da agregação plaquetária.

Estudos realizados por Zhuo e colaboradores demonstraram a inibição da agregação plaquetária de neolignanas derivadas da *Selaginella moellendorffii* com o agonista ADP. Além disso, Kang e colaboradores mostraram que a neolignana isolada da *Myristica fragrans*, diminuiu a agregação plaquetária interferindo em uma via de sinalização ao invés de agir diretamente na ligação entre os agonistas e os seus receptores presentes nas plaquetas. Essa inibição ocorreu por um aumento do AMPc e inibição da mobilização intracelular do Ca<sup>2+</sup> (Zhuo, JX., et al, 2016 e Kang, JW. et al, 2013). Isso pode explicar a potencial ação antiagregante plaquetária do AGDZ 6.

Conforme a Figura 9, pode-se observar que todas as concentrações (3,125 µM a 100 µM) foram capazes de diminuir a produção de EROS. As plaquetas são alvos das EROS, já que essas espécies controlam algumas vias de sinalização, regulando a ativação, agregação e recrutamento plaquetário. Dessa forma, quando EROS estão aumentadas, ocorre hiperativação plaquetária, aumentando a agregação plaquetária (Masselli et al., 2020).

Dessa maneira, o composto AGDZ 6 apresentou potencial antiagregante plaquetário, uma vez que houve diminuição significativa da produção de EROS, tendo

como consequência a diminuição da hiperativação das plaquetas. Esses resultados atrelados a diminuição da agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina reforçam tal efeito.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o AGDZ 6 obteve diminuição considerável da agregação plaquetária, principalmente com o agonista ADP. Ademais, essa diminuição da agregação plaquetária possivelmente está atrelada a atividade antioxidante do AGDZ 6, uma vez que esse composto demonstrou inibir a produção de EROs, o que justifica a diminuição da agregação entre as plaquetas, o que torna o AGDZ 6 um excelente protótipo para um antiagregante plaquetário. Além disso, o composto apresentou boa biodisponibilidade oral, baixa irritabilidade, mutagenicidade e toxicidade, tanto preditiva, quanto sobre as plaquetas humanas

Com isso, o AGDZ 6 se mostrou promissor para novas terapias que inibem a agregação plaquetária, além de contribuir para pesquisas futuras dos análogos isoxazólicos de uma neolignana tetrahidrofurânica.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. et al. A terapêutica antitrombótica. **Angiologia e Cirurgia Vascul**. V 12, e. 3, p. 170-179, Setembro, 2016
- ALBUQUERQUE, H. P. C.; VIDAL, P. C. Trombose venosa profunda: revisão dos conceitos atuais. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v. 31, n. 10, p. 851 – 856, Outubro, 1996.
- AVENIENTE, M. Síntese de Neolignanas 8.O.4', Derivados e Análogos ativos em Leishmania. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.
- BARUZZI, Antonio Claudio do Amaral et al. Trombose Venosa Profunda. Profilaxia. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 67, n. 3, p. 2015 — 2018, 1996.
- BASILIO, D.C.L.S *et al.* Chemical profile and antithrombotic activity of the essential oil of *Levisticum officinale* WDJ Koch (Apiaceae). **Chemical Papers**, p. 1-10, 2024.
- CAGNOLATI, D. et al. Hemostasia e Distúrbios da Coagulação. **Revisão sobre Hemostasia – USP**. Disponível em: [https://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia\\_revisado.pdf](https://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia_revisado.pdf) . Acesso em: 23/08/2023
- CARMEN, Rodríguez Dávila Sinaí de et al. Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica. **Revista Mexicana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio**, México, v. 66, n. 4, p. 227 — 233, out./dez. 2019.
- CHARLO, P. B.; HERGET, A. R.; MORAES, A. O. Relação entre trombose venosa profunda e seus fatores de risco na população feminina. **Global Academic Nursing Journal**. Maringá, v. 1, n.1, e. 10, 2020
- CHAVES, D. S. A. et al. Metabólitos secundários de origem vegetal: Uma Fonte Potencial de Fármacos Antitrombóticos. **Química Nova**. v. 33, n. 1. p. 172-180, 2010.

CUSHMAN, M. Seminário de Hematologia. **Science Direct**. v. 44, e. 2, p. 62-69, Abril, 2007

DOENÇAS Cardiovasculares. **Organização Pan-Americana de Saúde**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares> . Acesso em: 22/08/2023.

ELISEU, A. C. P., Abordagem da Trombose Venosa Profunda nos Cuidados de Saúde Primários. 2022. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Medicina — Universidade Beira Interior. Portugal, 2022.

EMBOLIA Pulmonar. **SBACVSP**. Disponível em: <https://sbacvsp.com.br/embolia-pulmonar/> . Acesso em: 22/08/2023

ENTENDA as Causas e Consequências da Trombose. Blog Saúde e Você, 2021. Disponível em: <https://www.hospitalmoinhos.org.br/institucional/blogsaudeevoce/entenda-as-causas-e-consequencias-da-trombose>. Acesso em: 21/08/2023.

ESPINOÇA, I.T. *et al.* Antithrombotic Effect of Oil from the Pulp of Bocaiúva—*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae). **Nutrients**, v. 16, n. 13, p. 2024, 2024.

FERREIRA, C. N. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, n. 5, p. 416 — 421, Novembro, 2010.

FOWKES, F. J. I, Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**. v. 25, e. 1, p. 5, Janeiro, 2003.

GODOY, J. M. P., Fatores de risco e eventos trombóticos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. São José do Rio Preto, v. 31, n. 3, Maio, 2009.

GÓMEZ, F. A. G. Fisiologia de la Hemostasia. **Revista Mexicana de Anestesiología**. México, v.40, n. 2, p. 398 – 400, jul./set., 2017.

GREMMEL, Thomas; MICHELSON, Alan D.; FRELINGER, Andrew L.. In Vivo and protease-activated receptor-1-mediated platelet activation in patients presenting for cardiac catheterization. *Platelets*, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 308-316, 10 nov. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2015.1095876>.

HAMERSCHLAK, N.; ROSENFELD, L. G. M. Utilização da Heparina e dos Anticoagulantes Orais na Prevenção e Tratamento da Trombose Venosa Profunda e da Embolia Pulmonar. **Arq. Brasileira de Cardiologia**. v. 67, n. 3, p. 209-213, Setembro, 1996.

JACOBSEN, F.T., Atividade antiagregante in vitro de análogos de dihidropiridinas - Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022

KANG, J. W.; MIN, B.; LEE, J. Anti-platelet Activity of *Erythro* -(7*S*, 8*R*)-7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan from *Myristica fragrans*. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 11, p. 1694–1699, 8 jan. 2013

KUMAR, V; ABBAS, A K; ASTER, J C. **Robbins patologia básica 10 ed**. Elsevier. Brasil. 2018

LONGHI, F.; LAKS, D.; KALIL, N. G. N. Trombocitopenia induzida por heparina. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 23, n. 2, Agosto, 2001.

MASSELLI, E. et al. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4866, 9 jul. 2020.

MEGA, Jessica L; SIMON, Tabassome. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *The Lancet*, [S.L.], v. 386, n. 9990, p. 281-291, jul. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60243-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60243-4).

NECA, C.S.M, et al. Incidence of thrombosis in women caused by the use of oral hormonal contraceptives: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 11, n.16, e 24111637332, 2022

PEREIRA, A. C. et al. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**. v. 72, n. 11 — 12, p. 1424 — 1430, Agosto, 2011.

PEREIRA, M.C.L. et al. Use of medicinal plants in care of women with gynecological diseases: integrative review. *International Journal of Development Research*, v. 09, n. 03, p. 26373-26380, 2019

RIBEIRO, J.C. Qualidade de plantas medicinais de uso popular no Brasil: uma visão experimental: roteiro de práticas. São João da Boa Vista: Editora Universitária, p. 45. UNIFAE, 2021.

RODRIGUES, E S et al. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RODRÍGUEZ, D.S.C., et al, Hemostasis and factors associated with thrombotic tendency. **Revista Mexicana de Patologia Clínica Medicina de Laboratorio**, v 66, e. 4, p. 227-233, 2019

SILVA, M.F., Efeitos adversos decorrentes do uso prolongado de fármacos anticoncepcionais - Bacharelado em Enfermagem, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2021

SILVA, A. A. DA; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 26 mar. 2010.

SILVESTRE L, MINISTRO A, EVANGELISTA A, PEDRO LM. Novos anticoagulantes orais no tromboembolismo venoso e fibrilação auricular. *Angiol Cir Vasc*. 2012;8(1):6-11.

SIMÕES, K.C.C. Papel do estresse oxidativo no envelhecimento - Monografia para conclusão de Curso, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2003

SOUSA, G.G, Síntese de 8,4'-Oxineolignanas e Análogos com Atividade Anticâncer - Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Química, Brasília, 2017

SOUSA, R.A.C, Estudo fitoquímico das folhas e galhos de *endlicheria paniculata* e avaliação das atividades biológicas dos extratos e neolignanas - Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021

TANIGUCHI, M.C, et al. Toxicidade dos Fármacos, capítulo 5.

TAKAHIRA, R. K. Distúrbios da Hemostasia em Veterinária: Patogenia e Avaliação Clínico-Laboratorial. **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**, Botucatu, p. 47 — 55, 2003

TUÑÓN, M. J. & JIMÉNEZ, R. Envejecimiento y estrés oxidativo. Papel de los antioxidantes. In: In: MARRONI, N.P. et al. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. 1ª ed, editora Ulbra, Porto Alegre, 2002. p.21-32.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, out. 2007.

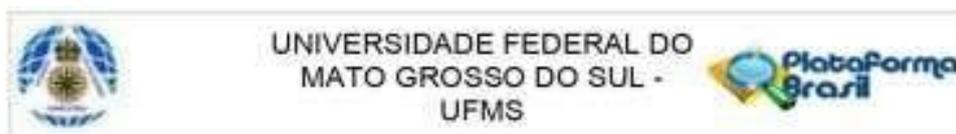
Yoshida RA, Yoshida WB, Rollo HA. Novos anticoagulantes orais para a profilaxia e tratamento do tromboembolismo venoso em cirurgias ortopédicas de grande porte. *J Vasc Bras*. 2011;10(2):145-53.

ZAIDI, A.; GREEN, L. Fisiologia da Hemostasia. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 20, e. 3, p. 152 — 158, Março, 2019

ZALESK, F; BON, D. J. D., POSPISIL, J. Lignans and Neolignans: Plant Secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, v146, p. 104-248, 2019

ZHUO, J.-X. et al. Neolignans from *Selaginella moellendorffii*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 3, p. 161–166, 7 abr. 2016.

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AÇÃO ANTITROMBÓTICA DE ANÁLOGOS ISOXAZÓLICOS DERIVADOS DE NEOLIGNANAS TETRAHIDROFURANICAS.

**Pesquisador:** EDUARDO BENEDETTI PARISOTTO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 68042722.8.0000.0021

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.835.526

#### Apresentação do Projeto:

A trombose associada a doenças arteriais é a principal causa de morbidade e mortalidade. A trombose pode levar a uma obstrução arterial, ocasionando déficit sanguíneo e perturbações no metabolismo celular das áreas afetadas. Em órgãos como coração e cérebro, a redução ou falta do suprimento sanguíneo pode induzir infarto ou acidente vascular cerebral (AVC). As dificuldades no tratamento de doenças cardiovasculares resultam na necessidade de investigar fármacos mais eficazes, seguros e com maior facilidade de uso, principalmente em um ambiente crônico. Deste modo, o estudo visa avaliar o potencial antitrombótico de 8 análogos isoxazólicos - AINT (4-11) derivados de (1-3), uma vez que esses compostos poderiam modular o estado redox plaquetário induzindo, assim, o efeito antitrombótico. Objetivos: Este estudo tem por objetivo investigar a ação antitrombótica (antiagregação plaquetária e anticoagulante) de análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas (AINT), num modelo experimental *in vitro* e *in vivo*. Metodologia: O plasma rico em plaquetas será avaliado na presença e ausência (veículo) dos AINT. A avaliação da agregação plaquetária será realizada por turbidimetria. A medida da secreção plaquetária será por fluorescência. A avaliação da coagulação será realizada em sistema semi-automatizado de coagulação. O estudo dos possíveis mecanismos de ação será feito por avaliação dos receptores plaquetários por citometria de fluxo e pelo estudo do balanço redox por espectrofotometria.

As amostras de sangue humano serão obtidas de doadores adultos (maiores de 18 anos)

**Endereço:** Av. Costa e Silva, s/nº - Foz de Iguaçu, Prédio das Pós-Graduações - Hércules Maymonez, 1º andar  
**Bairro:** Foz de Iguaçu **CEP:** 75.070-900  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (87)3345-7187 **Fax:** (87)3345-7187 **E-mail:** cep@unop.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 5.835.529

Indivíduos e saudáveis, sem histórico de hemorragias ou trombose, de maneira voluntária. Amostras de sangue total (5 mL) será coletado com seringa e agulha estéreis e descartáveis por profissional autorizado e capacitado do laboratório didático de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas (LAC/FACFAN).

#### Objetivo da Pesquisa:

Estudar a ação antitrombótica dos Análogos Isoxazólicos Derivados de Neolignanas Tetrahidrofurânicas (AINT) num modelo experimental *in vitro*.

#### Objetivo Secundário:

- 1 Avaliar o efeito dos AINT sobre ativação plaquetária;
- 2 Avaliar o efeito dos AINT sobre a agregação plaquetária;
- 3 Avaliar o efeito dos AINT sobre a secreção plaquetária;
- 4 Avaliar o efeito dos AINT sobre a coagulação sanguínea;
- 5 Investigar os possíveis mecanismos de ação por meio de:
  - Expressão de receptores plaquetários e espécies reativas de oxigênio (EROs);
  - Avaliação do balanço redox.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Riscos:

A retirada de sangue venoso é um método corriqueiro na investigação clínica e científica, sem graves consequências para o doador. Contudo é considerada uma técnica invasiva visto que a agulha penetra na pele até chegar na veia. O maior problema é uma leve dor, e o desconforto de agulhas e da punção; porém se houver qualquer desconforto, o participante tem o direito de desistir a qualquer momento. Em raras ocasiões pode ocorrer: hematomas (durante ou após a realização da punção venosa); punção em artéria; anemia iatrogênica (em casos de volumes maiores a 100 mL); lesão nervosa; infecção. Em caso de qualquer complicação o contratante dos pesquisadores arcará com as despesas produzidas pelo procedimento. O risco associado de quebra de sigilo aos dados do participante será minimizado por meio do uso somente de um número de identificação e somente os pesquisadores terão acesso aos dados.

##### Benefícios:

Não há benefício direto ao participante. Entretanto, ao partir deste estudo poderá ser identificada uma nova biomolécula que pode beneficiar o tratamento de doenças cardiovasculares associadas à

**Endereço:** Av. Costa e Silva, s/nº - Fonecos, Prédio dos Pró-Reitores (Hércules Maymon), 2.º andar  
**Bairro:** Fonecos **CEP:** 70.070-900  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (071)345-7167 **Fax:** (071)345-7167 **E-mail:** ospconex.prop@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 5.835.926

trombose

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo experimental com coleta de material biológico (sangue) por pesquisadores com formação na área de saúde. O estudo envolve apenas participantes brasileiros de ambos os sexos e, a coleta de sangue ocorrerá entre março de 2023 e outubro de 2026.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram corretamente apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram observados óbices éticos nos documentos do estudo.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n.º 466, de 2012, e na Norma Operacional n.º 001, de 2013, do CNS, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa.

É de responsabilidade do pesquisador submeter ao CEP semestralmente o relatório de atividades desenvolvidas no projeto e, se for o caso, comunicar ao CEP a ocorrência de eventos adversos graves esperados ou não esperados. Também, ao término da realização da pesquisa, o pesquisador deve submeter ao CEP o relatório final da pesquisa. Os relatórios devem ser submetidos através da Plataforma Brasil, utilizando-se da ferramenta de NOTIFICAÇÃO.

Informações sobre os relatórios parciais e final podem acessadas em <https://cep.ufms.br/relatorios-parciais-e-final/>

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_2058722.pdf	07/12/2022 15:51:50		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SEIINFRA.pdf	07/12/2022 11:20:01	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
Folha de Rosto	folhad rostero_comassinaturas.pdf	07/12/2022 10:46:28	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	06/12/2022 15:37:20	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros, Prédio dos Pró-Reitorias (Hércules Maymon), 1ª andar  
Bairro: Pioneiros CEP: 79.070-900  
UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: cspconop.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 5.835.526

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/12/2022 15:37:20	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	material_biologico_assin.pdf	06/12/2022 15:36:55	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
Orçamento	Orçamento.pdf	06/12/2022 15:36:41	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODETALHADO.pdf	06/12/2022 15:35:52	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPO GRANDE, 22 de Dezembro de 2022

Assinado por:  
**MALSON NEILSON DE LUCENA**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros, Prédio das Pró-Reitorias (Hércules Maymon), 1ª andar  
**Bairro:** Pioneiros **CEP:** 75.070-900  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (071)3345-7187 **Fax:** (071)3345-7187 **E-mail:** osproconep.propp@ufms.br

**ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**Anexo I – TCLE****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Título da pesquisa**

**Efeitos biológicos dos análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas (AINT).**

Eu, o pesquisador: Eduardo Benedetti Parisotto, convido(a) Sr.(a) a participar desta pesquisa que tem como objetivo: estudar a ação antitrombótica dos análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas (AINT) num modelo experimental *in vitro*.

Envolvimento na pesquisa: Ao participar deste estudo o Sr.(a) permitirá que sejam coletados 5 mL de sangue venoso com seringa e agulha estéreis e descartáveis por profissional autorizado e capacitado do laboratório didático de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas (LAC/FACFAN). O uso das amostras de sangue serão exclusivamente utilizadas como reagentes (fonte de plasma rico plaquetas) para realização dos testes plaquetários e de coagulação e não serão utilizadas para obtenção de dados adicionais (realização de exames) do participante.

**1. SOBRE A PESQUISA:** Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental com o objetivo de avaliar o possível efeito antitrombótico e anticoagulante dos produtos naturais citados acima.

**2. CONFIDENCIALIDADE:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Além disso, não serão realizados quais exames das amostras ou qualquer procedimento de identificação do participante. Não será realizada divulgação de dados que identifique o participante.

Rubrica do Participante: \_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador: \_\_\_\_\_



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**3. PAGAMENTO:** O(a) Sr.(a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como não terá direito a nenhuma compensação financeira por sua participação, sendo sua colaboração na pesquisa livre e de espontânea vontade.

**4. RISCOS:** A retirada de sangue venoso é um método corriqueiro na investigação clínica e científica, sem graves consequências para o doador. Contudo é considerada uma técnica invasiva visto que a agulha penetra na pele até chegar na veia. O maior problema é uma leve dor, e o desconforto de agulhas e da punção; porém se houver qualquer desconforto, o participante tem o direito de desistir a qualquer momento. Em raras ocasiões pode ocorrer: hematomas (durante ou após a realização da punção venosa); punção em artéria; anemia iatrogênica (em casos de volumes maiores a 100 mL); lesão nervosa; infecção. Em caso de qualquer complicação o contratante dos pesquisadores arcará com as despesas produzidas pelo procedimento. O risco associado de quebra de sigilo aos dados do participante será minimizado por meio do uso somente de um número de identificação e somente os pesquisadores terão acesso aos dados.

**5. BENEFÍCIOS:** Não há benefício direto ao participante. Entretanto, ao partir deste estudo poderá ser identificada uma nova biomolécula que pode beneficiar o tratamento de doenças cardiovasculares associadas à trombose.

O Sr.(a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o Sr.(a). Sempre que quiser, poderá pedir mais informações sobre a pesquisa por meio dos e-mails dos pesquisadores e do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul abaixo discriminados.

Rubrica do Participante: \_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador: \_\_\_\_\_



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



O participante possui a garantia de receber uma via deste termo e em caso de qualquer dano decorrente desta pesquisa terá direito à indenização.

Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão mantidos em arquivo digital em posse dos pesquisadores responsáveis pelo período de 5 anos contabilizados a partir do encerramento da pesquisa e serão indisponibilizados ao fim deste prazo.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre e espontânea para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

#### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Tendo em vista os itens acima apresentados de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa. Declaro que recebi cópia desse termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Campo Grande, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do participante da pesquisa**

\_\_\_\_\_  
**Eduardo Benedetti Parisotto**

Laboratório de Análises Clínicas – LAC – Hematologia/LAC/FACFAN  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

Rubrica do Participante: \_\_\_\_\_

Rubrica do Pesquisador: \_\_\_\_\_



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Campus Universitário 79070900 - Campo Grande, MS – Brasil- Telefone: (067)  
3345-7962

e-mail: eduardo.parisotto@ufms.br, parisotto.edu@gmail.com

**PARA MAIORES ESCLARECIMENTOS**

Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, prédio das Pró-Reitorias 'Hércules Maymone' – 1º andar, CEP: 79070900. Campo Grande – MS. e-mail: cepconep.propp@ufms.br; telefone: 3345-7187;

Atendimento ao público: 07:30-11:30 no período matutino e das 13:30 às 17:30 no período vespertino.

Rubrica do Participante: \_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador: \_\_\_\_\_