

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

RAFAEL SEIJI NAKANO OTA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTITROMBÓTICA DE UM ANÁLOGO ISOXAZÓLICO
DERIVADO DE NEOLIGNANA TETRAHIDROFURÂNICA**

CAMPO GRANDE, MS

2023

RAFAEL SEIJI NAKANO OTA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTITROMBÓTICA DE UM ANÁLOGO ISOXAZÓLICO
DERIVADO DE NEOLIGNANA TETRAHIDROFURÂNICA**

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

2023

RAFAEL SEIJI NAKANO OTA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTITROMBÓTICA DE UM ANÁLOGO ISOXAZÓLICO
DERIVADO DE NEOLIGNANA TETRAHIDROFURÂNICA**

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, 23 de Novembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto – UFMS – Orientador

Prof. Dr. Adriano César de Moraes Baroni – UFMS

Prof. Dr. Éverton Nascimento Alencar – UFMS

SUPLENTE DE BANCA

Dra. Kelly Juliana Filippin – UFMS

RESUMO

As principais causas de mortes no mundo são as doenças cardiovasculares, sendo a trombose associada a doenças arteriais, uma das principais causas de morbidade e mortalidade. A trombose pode levar à obstrução arterial, ocasionando déficit sanguíneo e perturbações no metabolismo celular das áreas afetadas. 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. Este estudo tem como objetivo investigar a ação antitrombótica (antiagregação plaquetária e anticoagulante) de um análogo isoxazólico derivado de neolignanas tetrahidrofuranicas (AINT 4), em modelo experimental *in vitro*. A síntese do AINT 4 foi realizada a partir de reações de cicloadição entre acetilenos terminais 12 e clorooximas 13 com padrões de substituição encontrados nas neolignanas. A análise preditiva (*in silico*) de biodisponibilidade oral e toxicidade do AINT 4 foi avaliada utilizando-se o software SwissADME® e por meio do Osiris® Property Explorer, respectivamente. A toxicidade *in vitro* do AINT 4 foi avaliada através do ensaio de exclusão de azul de trypan em plaquetas. A avaliação da agregação plaquetária foi realizada em plasma rico em plaquetas (PRP), por turbidimetria, sendo que o AINT 4 em foi avaliado em diferentes concentrações (9,375 - 300 µM), utilizando dois diferentes agentes agregantes, adenosina difosfato (ADP) e epinefrina (EPI). A avaliação da coagulação foi realizada em plasma utilizando sistema semi-automatizado de coagulação. A análise estatística foi por análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer, com nível de significância menor que 0,05. Os resultados mostraram que o AINT 4 inibiu significativamente a agregação plaquetária tanto com ADP (inibição média de 22,27%) quanto EPI (inibição média de 17,47%) nas concentrações testadas. Além disso, o AINT 4 apresentou uma diminuição significativa no tempo de protrombina (TP). Adicionalmente, o AINT 4 mostrou ter um efeito na ativação plaquetária, resultando em uma redução média de 27% na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, os resultados indicam que o AINT 4 apresenta potencial ação antitrombótica.

Palavras-chaves: Doenças cardiovasculares, trombose, plaquetas, antiagregante, anticoagulante.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases stand as the leading global cause of mortality, being the thromboses associated with arterial diseases one of the main causes of morbidity and mortality. Thrombosis can lead to arterial obstruction, compromising the blood supply and disturbing the cellular metabolism in affected areas. The treatment of cardiovascular diseases presents numerous challenges, resulting in the need for more efficacious, safe, and user-friendly medications, especially within specialized contexts. Therefore, this study aims to investigate the antithrombotic activity (antiplatelet aggregation and anticoagulant) of an isoxazole analogue derived from tetrahydrofuran neolignans (AINT 4), in an *in vitro* experimental model. The synthesis of AINT 4 was carried out from cycloaddition reactions between terminal acetylenes 12 and chlorooximes 13 with substitution patterns found in neolignans. The predictive analysis (*in silico*) of bioavailability and oral toxicity of AINT 4 was evaluated using the SwissADME[®] software and Osiris[®] Property Explorer, respectively. The evaluation of platelet aggregation was carried out by turbidimetry, with AINT 4 being evaluated in different concentrations, using different agonists such as ADP and adrenaline, while the evaluation of coagulation was carried out in plasma using a semi-automated coagulation system. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA), complemented by the Tukey-Kramer test, with a significance level lower than 0.05. The results showed that AINT 4 significantly inhibited platelet aggregation with both ADP (mean inhibition of 22.27%) and EPI (mean inhibition of 17.47%) at the tested concentrations. Furthermore, AINT 4 exhibited a noteworthy reduction in prothrombin time. Additionally, AINT 4 has shown to have an effect on platelet activation, resulting in an average reduction of 27% in the production of reactive oxygen species (ROS). Therefore, these findings indicate the antithrombotic activity of AINT 4.

Keywords: Cardiovascular diseases, thrombosis, platelets, antiplatelet, anticoagulant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das neolignanas tetrahidrofurânicas.....	12
Figura 2 - Estrutura química do análogo isoxazólico derivado de neolignanas tetrahidrofurânicas 4 (AINT 4).	13
Figura 3 - Hemostasia primária – ativação plaquetária	15
Figura 4 - Hemostasia secundária ou cascata de coagulação	17
Figura 5 - Estrutura química de fenilpropanoide e neolignana	20
Figura 6 - Estrutura química do grupo isoxazol	20
Figura 7 - Estrutura química de neolignana tetrahidrofurânica e o AINT 4	21
Figura 8 - Efeito tóxico do AINT 4 sobre as plaquetas humanas	29
Figura 9 - Efeito do AINT 4 sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP).....	30
Figura 10 - Efeito do AINT 4 sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina	31
Figura 11 - Efeito do AINT 4 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros teóricos de biodisponibilidade oral do AINT 4 determinados pela ferramenta SwissADME®.....	28
Tabela 2 - Parâmetros de toxicidade teórica do AINT 4 avaliado pelo software Osiris® Property Explorer	28
Tabela 3 - Efeitos do AINT 4 sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AINT	Análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahydrofurânicas
AINT 4	Análogo isoxazólico derivado de neolignana tetrahydrofurânica 4
AVE	Acidente vascular encefálico
CEP-SH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-SH)
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
Ca ²⁺	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
FL	Fosfolipídios
FT	Fator tecidual
FVII	Fator VII
FvW	Fator de von Willebrand
GP	Glicoproteína
GPIb	Glicoproteína Ib
GPIIb/IIIa	Complexo de glicoproteínas IIb e IIIa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAM	Infarto agudo do miocárdio
LAC	Laboratório de análises clínicas
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAR	Receptor ativador de protease
PM	Peso molecular
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas

RNI Razão Normalizada Internacional

SOD Superóxido dismutase

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

THF Tetrahydrofurano

TP Tempo de protrombina

TTPa Tempo de tromboplastina parcial ativada

TVP Tromboembolismo venoso profundo

TXA2 Tromboxano A2

UFMS Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

XOR Xantina oxidoreductase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1.	HEMOSTASIA.....	14
2.1.1.	Hemostasia primária.....	14
2.1.2.	Hemostasia secundária	16
2.2.	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	17
2.3.	DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TRATAMENTO	18
2.4.	COMPOSTOS SINTÉTICOS.....	19
2.4.1.	Análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas ...	19
3.	OBJETIVOS.....	22
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3.2.1.	Verificar <i>in silico</i> a biodisponibilidade oral;.....	22
3.2.2.	Verificar <i>in silico</i> a toxicidade do AINT 4, avaliando mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos negativos sobre a reprodução e irritabilidade <i>in silico</i> ;	22
3.2.3.	Avaliar do efeito do AINT 4 sobre a viabilidade das plaquetas;	22
3.2.4.	Avaliar o efeito do AINT 4 sobre a:	22
3.2.5.	Avaliar o efeito do AINT 4 sobre a ativação plaquetária: Produção de espécies reativa de oxigênio (EROs)	22
4.	METODOLOGIA	23
4.1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	23
4.2.	SÍNTESE DO ANÁLOGO ISOXAZÓLICO DERIVADO DE NEOLIGNANA TETRAHIDROFURANICA 4 (AINT 4).....	23
4.3.	ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DO AINT 4	23
4.4.	COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS PLAQUETAS.....	24
4.5.	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE COM AZUL DE TRYPAN	25
4.6.	ATIVIDADE BIOLÓGICA	25
4.6.1.	Agregação plaquetária.....	25
4.6.2.	Atividade anticoagulante.....	26
4.7.	ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	26
4.7.1.	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	26

4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5.	RESULTADOS	28
5.1.	ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS AINT 4.....	28
5.2.	EFEITO DO AINT 4 SOBRE A VIABILIDADE DE PLAQUETAS	29
5.3.	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE DO AINT 4	29
5.4.	ATIVIDADE DO AINT 4 SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	31
5.5.	ATIVIDADE DO AINT 4 NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) POR PLAQUETAS	32
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS.....	44
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	48

1. INTRODUÇÃO

Para manter nosso sistema vascular em condições fisiológicas normais existe a hemostasia, processo que garante a manutenção do fluxo sanguíneo e impede grandes perdas de sangue em caso de lesão (Carmen *et al.*, 2019). Nesse sentido, sabe-se que as plaquetas desempenham um importante papel no equilíbrio da hemostasia, no entanto, alterações neste equilíbrio, seja por fatores genéticos ou alguma condição adquirida, podem levar a hipercoagulação, levando à formação de trombos (Mattheij *et al.*, 2016; Nagy *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de trombos é associado a fatores como: lesão endotelial por toxinas, hipertensão, inflamação e produtos metabólicos, fluxo sanguíneo anormal, estase ou turbulência devido a aneurismas e placas ateroscleróticas; hipercoagulabilidade primária (fator de Leiden, aumento da síntese de protrombina e deficiência de antitrombina III) e secundária (repouso no leito, dano tecidual e malignidade) (Albricker *et al.*, 2022).

No mundo, as doenças cardiovasculares (DCV), como a trombose, são as principais causas de morte, a saber, em 2019 as DCV foram responsáveis por 17,9 milhões de óbitos (OMS, 2021). No Brasil, as internações ocasionadas por DCV, principalmente por infarto agudo do miocárdio (IAM), ocupam 10,2% dos leitos do Sistema Único de Saúde (SUS) (Nicolau *et al.*, 2021).

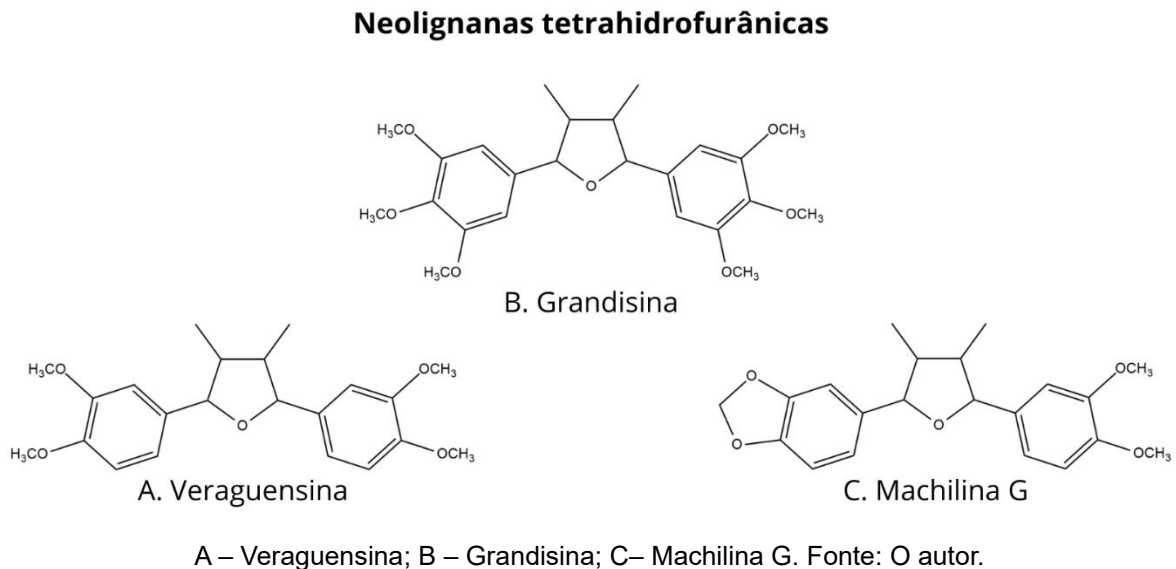
Sabe-se que tanto os medicamentos antiagregantes, quanto os anticoagulantes possuem diversas limitações como efeitos adversos. A saber, o principal efeito adverso do uso de antiagregantes é a hemorragia, principalmente no trato gastrointestinal. Adicionalmente, anticoagulantes também aumentam o risco de sangramento (Kubatka *et al.*, 2022).

Com isso, percebe-se dificuldades no tratamento farmacológico com antiagregantes plaquetários, as quais resultam, assim, na necessidade de ampliar pesquisas com novos protótipos de antiagregantes, visando uma maior eficácia, segurança e menos efeitos adversos (Van Der Meijden; Heemskerk, 2019; Albricker *et al.*, 2022). Assim, essas propriedades podem ser alcançadas com o desenvolvimento de compostos derivados sintéticos.

Neolignanas tetrahidrofurânicas como Veraguensina, Grandisina e Machilina G ilustradas nas Figura 1A, 1B e 1C respectivamente, são produtos naturais com ampla

gama de atividade biológicas entre elas: anti-inflamatória, antihiperlésica, antioxidante, neuroprotetora e antiparasitária (Silva-filho *et al.*, 2008).

Figura 1 - Estrutura química das neolignanas tetrahidrofurânica.

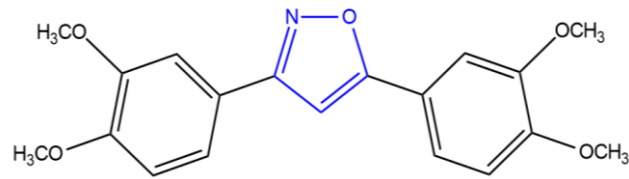


Conforme Biftu e colaboradores (1986) a atividade antiplaquetária de neolignanas como a veraguensina (Figura 1A) tem sido demonstrada e podem ser considerados potenciais compostos para estudos de modificação molecular no desenvolvimento de análogos com atividade antiagregante plaquetária e anti-inflamatória. Estudos recentes demonstraram que derivados isoxazólicos das neolignanas possuem destacada atividade antileishmania (Neves *et al.*, 2019).

Estudos anteriores e recentes, demonstram que os análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas (AINT) possuem diversas atividades biológicas (Neves *et al.*, 2019; Silva-filho *et al.*, 2008). Visto isso, este estudo foca-se no AINT 4, molécula ilustrada na Figura 2, que é derivado das neolignanas presentes na Figura 1.

Considerando a importância do desenvolvimento de novos medicamentos com ação antitrombótica e os desafios dos atuais tratamentos farmacológicos dos mesmos, torna-se necessário ampliar os estudos de compostos com possível atividade antitrombótica, sendo os derivados isoxazólicos de neolignanas um potencial candidato para tal efeito.

Figura 2 - Estrutura química do análogo isoxazólico derivado de neolignanas tetrahidrofurânicas 4 (AINT 4).



Fonte: O autor.

Logo, este estudo visa avaliar o efeito antitrombótico do análogo isoxazólicos 4 (AINT 4).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico complexo responsável por manter a fluidez sanguínea e integridade vascular em condições fisiológicas e formar trombos para prevenir perdas de sangue após lesão vascular (Carmen *et al.*, 2019). Apesar do processo hemostático ocorrer simultaneamente, é possível segmentá-lo em três fases: hemostasia primária, secundária (coagulação) e terciária (fibrinólise) (Frydman; Pate; Vitsky, 2018; Sepúlveda; Palomo; Fuentes, 2015).

2.1.1. Hemostasia primária

A hemostasia primária possui como principais constituintes o endotélio, plaquetas, micropartículas e FvW (Fator de von Willebrand). Esta fase é dividida em: vasoconstrição, adesão, ativação e agregação plaquetária (Zaidi; Green, 2019). Inicialmente, sabe-se que o dano endotelial estimula a adesão, ativação e agregação plaquetária, bem como a coagulação (Thomas, 2019). Levando, assim, a vasoconstrição, um evento transitório com a finalidade de retardar a perda de sangue e diminuir o fluxo sanguíneo do local lesionado. Substâncias vasoconstritoras como a endotelina 1, serotonina e tromboxano A₂ (TXA₂) podem agir diretamente nas células musculares lisas (Rodrigues *et al.*, 2012).

A adesão plaquetária ocorre pela interação ligante-receptor e é seguido pela ativação plaquetária (Vilahur *et al.*, 2018). Com a lesão vascular e a consequente interação do receptor da plaqueta GPIb ao FvW, inicia-se a adesão plaquetária (Figura 3). Em seguida, por sinalização, as plaquetas são ativadas, expondo novos receptores que ao interagirem com agonistas tais como o FvW, colágeno e fibronectina, intensificam a adesão plaquetária no endotélio (Kazmi; Boyce; Lwaleed, 2015).

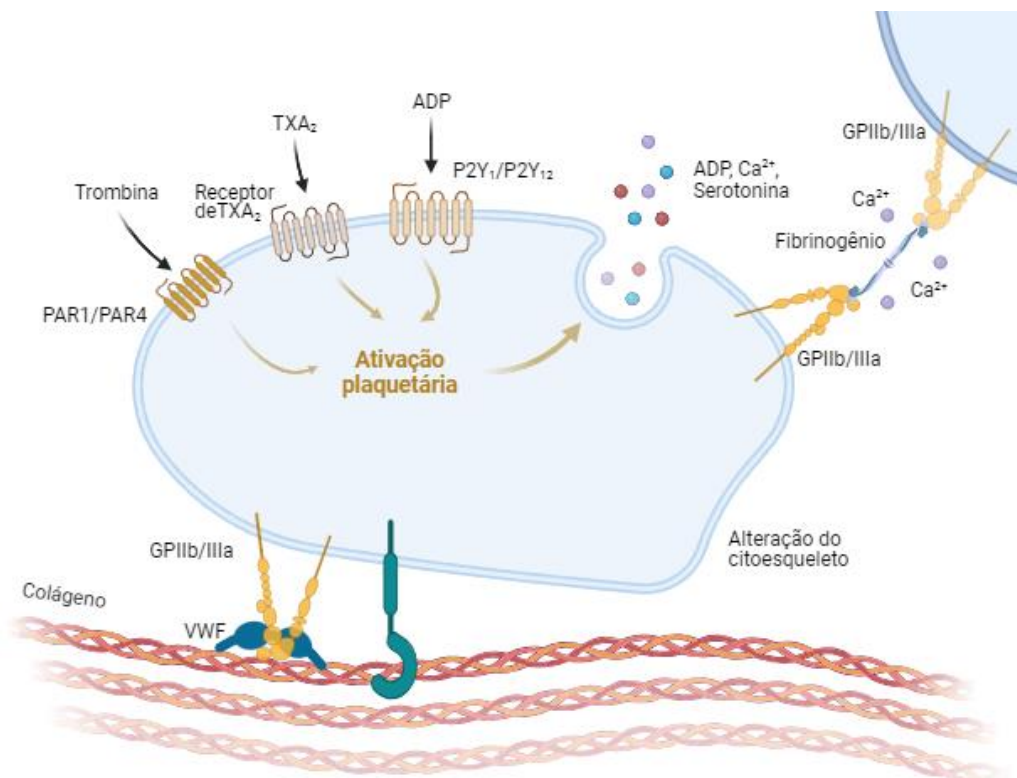
Na ativação plaquetária, sabe-se que os principais agonistas plaquetários são: adenosina difosfato (ADP), trombina, TXA₂, colágeno e epinefrina (Jurk; Kehrel, 2005). Em sua ativação, ocorre a mudança na conformação plaquetária que passa de sua forma discóide para esférica e por fim irregular com extensão de pseudópodes,

isso deve-se ao aumento no influxo do cálcio (Ca^{2+}) que ativa o sistema actina-miosina das plaquetas (Zaidi; Green, 2019).

As plaquetas possuem três tipos de grânulos: grânulos alfa, grânulos densos e lisossomos. Nos grânulos densos estão armazenados serotonina, ADP, epinefrina e íons Ca^{2+} , resultando na amplificação da ativação das plaquetas (Frydman; Pate; Vitsky, 2018). Já nos lisossomos há proteases e outras enzimas que ajudam na manutenção do trombo e depuração de plaquetas, nos grânulos alfa estão presentes alguns fatores de coagulação (Jenne; Urrutia; Kubes, 2013).

A agregação plaquetária é a fase no qual ocorrem as conexões entre plaquetas. Isso ocorre pois os receptores GPIIb e GPIIa são alterados de forma que se ligam ao fibrinogênio que atuará como uma “ponte”, conectando as plaquetas. Além disso, outras glicoproteínas ligam-se a esses receptores, e a junção dessas conexões é o chamado tampão hemostático (Zaidi; Green, 2019). O tampão hemostático é um processo transitório que inibe brevemente o sangramento e auxilia nos próximos passos da cascata de coagulação.

Figura 3 - Hemostasia primária – ativação plaquetária



VWF = Fator Von Willebrand (FvW); TXA₂ = Tromboxano A₂; PAR= Receptor ativador de protease;
GP = Glicoproteína . Fonte: adaptado de Haley; Recht; McCarty, 2014

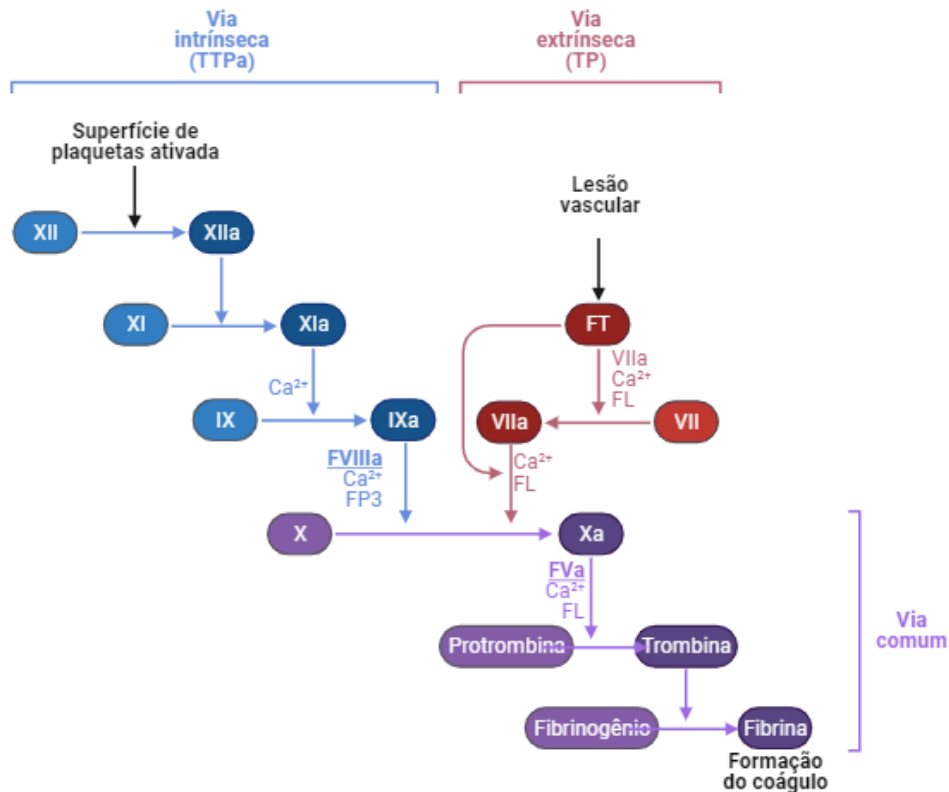
2.1.2. Hemostasia secundária

A hemostasia secundária, ou a coagulação, é um processo que envolve diversas reações enzimáticas e seus cofatores que levam à formação de um coágulo de fibrina (Austin, 2017). O processo de coagulação é classificado, pelo modelo clássico, em vias extrínseca e intrínseca (Figura 4). Porém, apesar desse modelo clássico ser útil em *in vitro*, ele não incorpora o papel central que as superfícies celulares possuem na coagulação (Zaidi; Green, 2019).

Portanto, o novo modelo possui três etapas: Iniciação, amplificação e propagação. Sendo a fase de iniciação iniciada pela exposição do fator tecidual (FT) que leva a ativação do Fator VII, com esse complexo FT-Fator VII é catalisado a ativação do fator IX e X, tendo a formação de uma pequena trombina (Zaidi; Green, 2019). Assim, durante a amplificação, esse pequeno traço de trombina ativa as plaquetas, o fator V, o fator XI e libera o FvW. E, com isso, inicia-se a propagação, onde o fator FX liga ao fator V já ativado gerando trombina que induzirá a agregação plaquetária e outros fatores de coagulação (Austin, 2017).

Por fim, regulado por inibidores, receptores e cofatores, o processo que remove o coágulo após a regeneração tecidual é chamado de fibrinólise (Chapin; Hajjar, 2015).

Figura 4 - Hemostasia secundária ou cascata de coagulação



FT = Fator tecidual; a = ativado; FL = Fosfolípidios. Fonte: Adaptado de Johari; Loke, 2012

2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Um radical livre é uma espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) constituem um termo amplo que abrange agentes oxidantes contendo radicais livres derivados da molécula de oxigênio (Halliwell; Gutteridge, 2015).

Nas células de mamíferos, existem diversas fontes de EROs, sendo algumas das mais significativas as reações catalisadas por Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), xantina oxidoreductase (XOR) e mieloperoxidase (MPO) (Bayir, 2005). As EROs têm papéis cruciais no organismo, participando em reações enzimáticas, no transporte de elétrons mitocondriais, na transdução de sinais, na expressão genética e na ação antimicrobiana de neutrófilos e macrófagos (Sies *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo acontece quando há um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, prejudicando o processo de reparo. Isso resulta na perturbação da

sinalização redox e controle, culminando em danos moleculares, conhecidos como dano oxidativo (Sies; Berndt; Jones, 2017).

Contudo, as células possuem um ambiente interno redutor que ajuda a prevenir danos causados pelos radicais livres. Esse ambiente redutor é mantido pela atividade antioxidante de enzimas e substâncias como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, ácido ascórbico (Vitamina C) e outras, as quais neutralizam ou reduzem os efeitos nocivos das EROs (Sies *et al.*, 2022).

As EROs desempenham papéis importantes no desenvolvimento de uma variedade de doenças, desde hipertensão e aterosclerose até distúrbios metabólicos, inflamação, infecções e processos neurodegenerativos (Alfadda, 2012). Diante disso, as EROs tornaram-se alvos terapêuticos vitais. Sendo assim, uma extensa pesquisa foi conduzida para explorar moléculas antioxidantes capazes de reduzir ou neutralizar a formação de EROs, com intuito de melhorar o estresse oxidativo e, conseqüentemente, prevenir e tratar doenças associadas às EROs (Chen *et al.*, 2018).

2.3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TRATAMENTO

No período de 2010 a 2020, as doenças no aparelho circulatório foram responsáveis por 27% dos óbitos, sendo a principal causa de morte no Brasil. Nesse sentido, sabe-se que as principais complicações foram doenças isquêmicas do coração e cerebrovasculares (Brasil, 2020).

Além das doenças isquêmicas cardíacas e acidentes vascular encefálico (AVE), o tromboembolismo venoso é uma outra importante doença cardiovascular aguda, sendo um terço dos casos de tromboembolismo venoso profundo (TVP) fatal ou podendo levar a complicações como a síndrome pós-trombótica. Na TVP pode ocorrer a oclusão total ou suboclusão maciça das veias, assim, a hipertensão venosa pode até impedir o fluxo arterial. Com essa elevada pressão hidrostática, ocorre a formação de edema, levando a destruição das arteríolas pela isquemia tecidual (Albricker *et al.*, 2022).

A desregulação do sistema hemostático ocorre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), como também a precipitação de eventos agudos de trombose arterial. Por isso, esses acabam sendo alvos terapêuticos para o tratamento de DCV (Gupta *et al.*, 2022).

Portanto, o tratamento é conduzido por meio de medicamentos antiagregantes e anticoagulantes. Os antiagregantes têm como alvo principal as plaquetas, inibindo sua ativação. Alguns dos principais agentes antiagregantes plaquetários incluem o ácido acetilsalicílico (AAS), clopidogrel e ticagrelor (Lorga Filho et al., 2013). Em contrapartida, os anticoagulantes atuam na cascata de coagulação como antagonistas desse processo. Entre os principais exemplos de anticoagulantes estão a heparina, fondaparinux e bivalirudina (Mega; Simon, 2015; Lorga Filho et al., 2013).

2.4. COMPOSTOS SINTÉTICOS

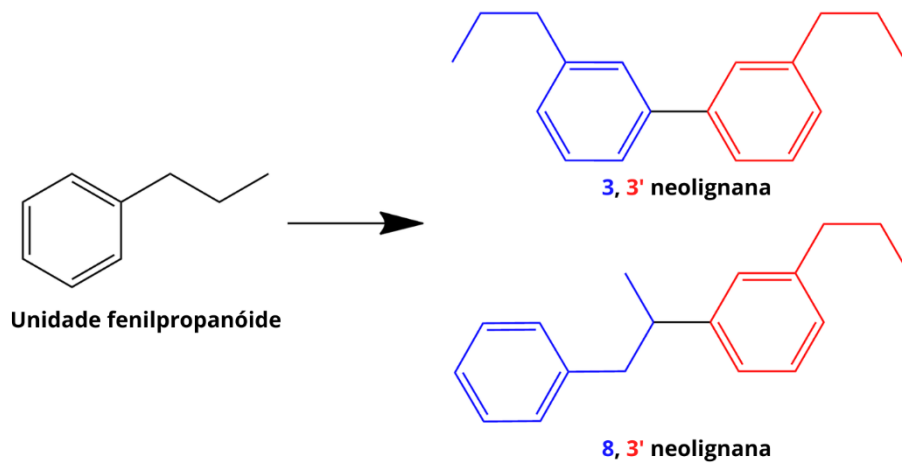
Sabe-se que os medicamentos antitrombóticos, tanto antiagregantes quanto anticoagulantes, possuem muitas limitações, tanto por conta de seu efeito clínico quanto por efeitos adversos (Dunn; Macaulay, 2011). Metabólitos secundários de plantas possuem um potente poder antioxidante, antiinflamatório e são capazes de inibir alguns processos, sendo capazes de atuarem como anticoagulantes e/ou antiagregantes (Seca; Pinto, 2018).

Esses compostos naturais podem ser uma alternativa importante para o tratamento de distúrbios hemostáticos. Adicionalmente a isso, alterações químicas partindo de metabólitos secundários podem ser eficazes em alterar o efeito destes, podendo trazer maiores benefícios clinicamente (Campos *et al.*, 2019).

2.4.1. Análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas

As neolignanas representam metabólitos secundários presentes em plantas, resultantes de acoplamentos oxidativos de fenilpropanóides (Figura 5). Esses compostos fenólicos demonstram uma ampla gama de atividades biológicas, que incluem propriedades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias, antineurodegenerativas, antivirais e antimicrobianas (Zalesak; Bom; Pospíšil, 2019).

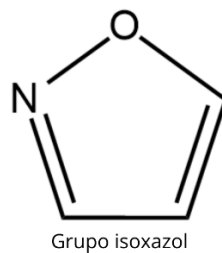
Figura 5 - Estrutura química de fenilpropanoide e neolignana



Fonte: O autor

O grupamento isoxazol é uma estrutura heterocíclica de cinco membros. O isoxazol possui dois heteroátomos, um átomo de oxigênio e um de nitrogênio na posição adjacente (Figura 6) (ZHU *et al.*, 2018). Na química farmacêutica, a inclusão do grupamento isoxazol pode contribuir para o aumento da eficácia, diminuição da toxicidade e melhoria dos perfis farmacocinéticos de moléculas alteradas sinteticamente (Sysak; Obminska, 2017).

Figura 6 - Estrutura química do grupo isoxazol

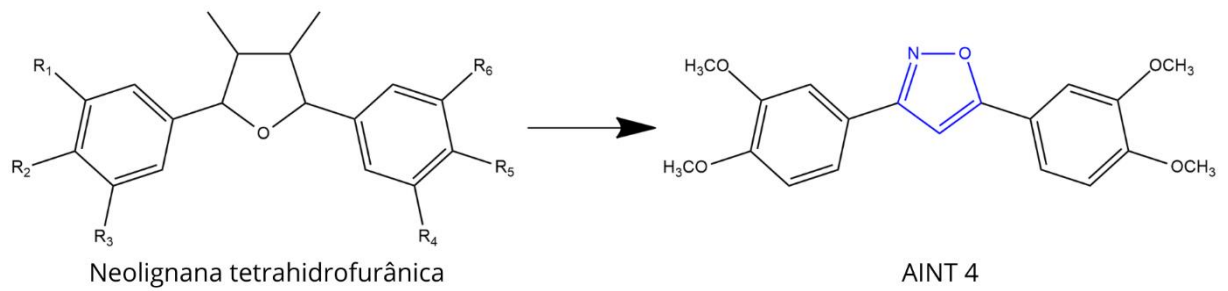


Fonte: O autor

Portanto, essas atividades podem ser aprimoradas com o desenvolvimento de seus derivados sintéticos, como por exemplo os derivados isoxazólicos das neolignanas. A saber, os derivados isoxazólicos de neolignanas possuem atividade anti-leishmania, como indicada por pesquisas realizadas recentemente por um grupo de pesquisa brasileiro (Neves *et al.*, 2019).

Visto isso, há necessidade de ampliar pesquisas com novos compostos, como o AINT 4 (Figura 2), um análogo isoxazólico derivado de neolignanas tetrahidrofurânicas (Figura 1; Figura 7)

Figura 7 - Estrutura química de neolignana tetrahidrofurânica e AINT 4



Fonte: O autor

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antitrombótica do análogo isoxazólicos derivado de neolignanas tetrahidrofurânicas 4 (AINT 4) em modelo experimental *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Verificar *in silico* a biodisponibilidade oral;

3.2.2. Verificar *in silico* a toxicidade do AINT 4, avaliando mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos negativos sobre a reprodução e irritabilidade *in silico*;

3.2.3. Avaliar do efeito do AINT 4 sobre a viabilidade das plaquetas;

3.2.4. Avaliar o efeito do AINT 4 sobre a:

- Agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina;
- Coagulação sanguínea sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

3.2.5. Avaliar o efeito do AINT 4 sobre a ativação plaquetária: Produção de espécies reativa de oxigênio (EROs)

4. METODOLOGIA

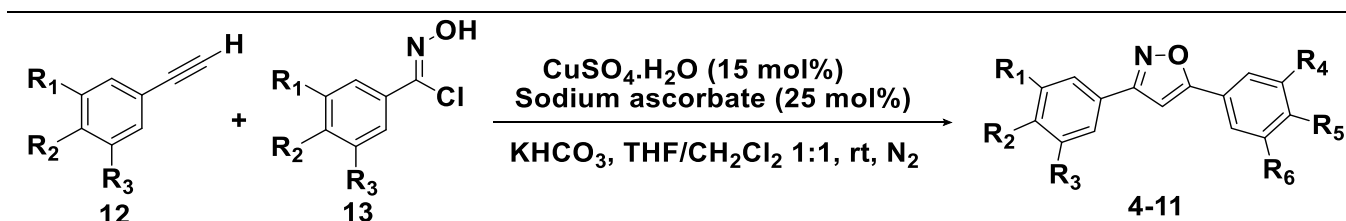
4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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 (CAAE: 66042722.8.0000.0021 – Anexo A)

4.2. SÍNTESE DO ANÁLOGO ISOXAZÓLICO DERIVADO DE NEOLIGNANA TETRAHIDROFURANICA 4 (AINT 4)

A síntese do derivado isoxazólico 4 (AINT 4) foi realizada a partir de reações de cicloadição [3+2] entre acetilenos terminais 12 e clorooximas 13 com padrões de substituição encontrados nas neolignanas 1-3 (Trefzger *et al.*, 2019). A síntese dos compostos (Esquema 1) foi realizada em colaboração com o Laboratório de Química Farmacêutica coordenado pelo Prof. Dr. Adriano César de Moraes Baroni da FACFAN/UFMS.

Esquema 1 - Representação esquemática da síntese dos análogos isoxazólicos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas (AINT)



* Condição de reação: 12a-c (2,0 mmol), 13a-c (2,0 mmol), CuSO₄·5H₂O (0,30 mmol), ascorbato de sódio (0,50 mmol), KHCO₃ (20 mmol), THF (3 mL), CH₂Cl₂ (3 mL), t.a., 24h.

4.3. ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DO AINT 4

A biodisponibilidade oral do AINT 4 foi avaliada utilizando-se o SwissADME[®], uma ferramenta online desenvolvida pelo Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) que

está disponível em <http://www.swissadme.ch/> e avalia de forma teórica a farmacocinética, semelhança com medicamentos e a compatibilidade química medicinal de compostos. No presente estudo, foi realizado teste *in silico*, a fim de prever os parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Os ensaios *in silico* avaliam a estrutura química utilizando a regra dos cinco, criada por Lipinski, podendo prever como a estrutura das entidades químicas pode influenciar na solubilidade e na permeabilidade de fármacos administrados por via oral. A regra dos cinco afirma que boa absorção e permeabilidade são mais prováveis quando: existem menos de cinco doadores de hidrogênio (soma de OH e NH na molécula); existem menos de dez receptores de ligação de hidrogênio (soma de O e N na molécula); o peso molecular é inferior a 500 g/mol; e Log P inferior a 5 (ou MLog P inferior a 4,15) (Lipinski *et al.*, 1997; Veber *et al.*, 2002). Resumindo, o composto foi avaliado segundo critérios, sendo eles: LogP (consenso dos LogP), 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), número de ligações rotacionáveis e área de superfície polar (TPSA).

Os ensaios de toxicidade foram realizados por meio do Osiris[®] Property Explorer, um software gratuito que, ao analisar a estrutura química dos compostos, mostra propriedades relevantes de medicamentos e possíveis medicamentos. Os parâmetros avaliados foram: mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos sobre a reprodução. Foram considerados as escalas de alto risco, médio risco e baixo risco.

4.4. COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS PLAQUETAS

As amostras de sangue humano (5 mL) foram obtidas de doadores individuais e saudáveis, sem histórico de hemorragias ou trombose, de maneira voluntária. A coleta foi realizada com seringa e agulha estéreis e descartáveis por profissional autorizado e capacitado do Laboratório de Hematologia Clínica pertencente ao Laboratório de Análises Clínicas da UFMS (LAC/FACFAN). O trabalho foi realizado após aprovação do Comitê de Ética de Humanos (CEP) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

A amostra foi coletada por punção venosa e em tubo contendo citrato de sódio (3,8 %) (9:1; m/v), utilizado como anticoagulante. O sangue foi centrifugado por 10

minutos a 900 x g e o plasma rico em plaquetas (PRP) foi utilizado para os ensaios plaquetários. As plaquetas foram ajustadas para $2,0 \times 10^8$ a $2,5 \times 10^8$ células/ mL em solução fisiológica para os testes de agregação plaquetária. Para os ensaios de coagulação, o tempo de protrombina ativada (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram utilizando o PRP.

4.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE COM AZUL DE TRYPAN

A avaliação da viabilidade plaquetária foi realizada por meio do teste de exclusão com azul de Trypan. Para a realização dos testes, 400 µL do pool de PRP foram incubados com os compostos (0 - 300 µM) ou DMSO (0,6% - veículo de dissolução do AINT 4) durante 5 minutos. Como controle positivo, usou-se os reagentes Triton X100 1% (v/v). Posteriormente às incubações, 50 µL de PRP tratado (compostos e controles) foram individualmente misturados com um volume igual de azul de Trypan 0,04% e transferidos para uma câmara de Neubauer para a contagem de plaquetas totais e de plaquetas não viáveis. As plaquetas que mantiveram um citoplasma claro ou branco foram consideradas viáveis, enquanto aquelas com citoplasma azulado foram classificadas como inviáveis. A viabilidade plaquetária foi determinada usando a Equação 1. Os resultados foram apresentados como porcentagem média de plaquetas viáveis e desvio padrão, e todos os experimentos foram realizados em triplicata, sem exceder o tempo de três horas após a coleta.

$$\text{Equação 1: Plaqueta viáveis (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ to tal de plaquetas viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de plaquetas}} \times 100$$

4.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.6.1. Agregação plaquetária

A avaliação da agregação plaquetária foi realizada por turbidimetria usando aparelho agregômetro semiautomatizado (EasyAgreg®, Qualitem). Foram usadas alíquotas de 400 µL ou 600 µL, dependendo do agente agregante a ser utilizado, da

suspensão centrifugada das plaquetas (PRP) e transferidas em uma curveta e homogeneizadas sob agitação de 180 g a 37 °C.

As plaquetas foram pré-incubadas com AINT 4 em diferentes concentrações (0-300 µM) a 37°C por 5 minutos antes da adição dos agonistas: Adenosina Difosfato (ADP, 30 µM, Sigma-Aldrich® St. Louis, USA) e epinefrina (EPI - 5 µg/mL; Hipolabor®, Minas Gerais, Brasil). A agregação foi medida em porcentagem (%) e registrada continuamente após a adição dos agonistas (Weber *et al.*, 2022). O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi usado como branco do ensaio. O veículo (DMSO 0,6%) foi usado como controle negativo e 10 µM de ticlopidina foi usado como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata, sem exceder o tempo de 3 horas após a coleta.

4.6.2. Atividade anticoagulante

Os testes de coagulação sanguínea foram realizados utilizando-se o equipamento semiautomatizado (CLOTimer®, Quick Timer), utilizando os kits comerciais (Wiener®). Para a realização deste ensaio, 100µL do PRP foi incubado à 37°C por 5 minutos com diferentes concentrações do AINT 4 (0 - 300µM). Em seguida, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram avaliados de acordo com Weber e colaboradores (2022). O veículo (0,6% v/v DMSO) foi utilizado como controle negativo e a heparina (17 UI/mL sangue) como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata, sem exceder o tempo de 3 horas após a coleta.

4.7. ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

4.7.1. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A ativação plaquetária foi avaliada pelo conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) intraplaquetário, determinado por intensidade de fluorescência (Reiniers *et al.*, 2017). Em uma placa de 96 poços, foram incubados, por 5 minutos, 200 µg de PRP ($2,5 \times 10^8$ células/µL) e seus respectivos controles (2,5 µg de DMSO 0,6%; ou 2,5 µg de H₂O₂), ou com o composto AINT 4 nas concentrações de 0 a 300

μM . Posteriormente, 10 μl de DCFH-DA (10 μM) foram adicionados a cada poço e incubados por 30 minutos. Após esta incubação, intensidade de fluorescência foi medida em 485 nm para excitação e 530 nm para emissão utilizando um espectrofotômetro multimodo (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific®, Vantaa, Finlândia). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada usando análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer, quando necessário, admitindo um nível mínimo de significância de $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPad Prim versão 8.0.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE PREDITIVA DE BIODISPONIBILIDADE ORAL E TOXICIDADE DOS AINT 4

Após a análise dos compostos, foi constatado que o AINT 4 atendeu aos critérios estabelecidos por Lipinski *et al.* (1997) e Veber *et al.* (2002), tendo zero violações, solubilidade moderada em água e alta absorção gastrointestinal (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros teóricos de biodisponibilidade oral do AINT 4 determinados pela ferramenta SwissADME®

Parâmetro	LogP	PM (g/mol)	n° O+N	n° OH+NH	n° rotb	TPSA	n° Violações
Ideal	≤ 4,15	< 500	≤ 10	≤ 5	< 10	≤ 140	≤ 1
AINT 4	3,38	341.36	6	0	6	62.95	0
AINT 4	Sol.	Solubilidade moderada		AINT 4	Abs. GI	Alta	

LogP – consenso dos LogP; PM – peso molecular; n° O+N – número de aceptores de ligação de H; n° OH+NH – número doadores de ligação de H; n° rotb – número de ligações rotacionáveis; TPSA – área de superfície polar topológica; n° violações – número de violações. Sol. – Solubilidade em água. Abs. GI – Absorção gastrointestinal. Fonte: O autor.

Os testes de toxicidade simulada conduzidos com o software Osiris® Property Explorer indicaram que o composto AINT 4 apresenta baixo risco em relação aos parâmetros avaliados, que incluem mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos negativos na reprodução, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de toxicidade teórica do AINT 4 avaliado pelo software Osiris® Property Explorer

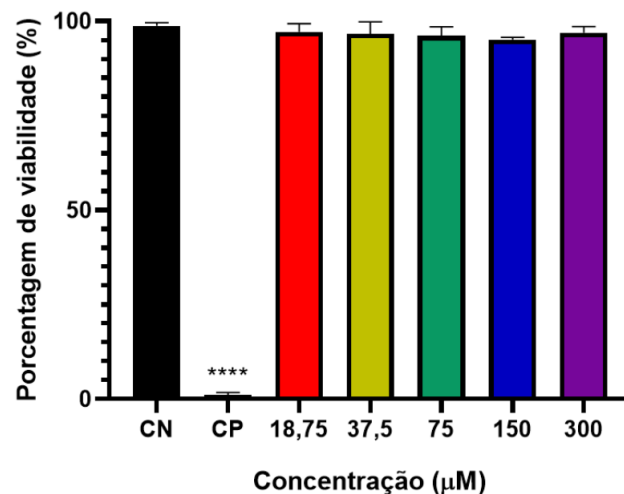
Parâmetro	Mutag.	Tumor.	Irritab.	Reprod.
Ideal:	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo Risco
AINT 4	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo Risco

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

5.2. EFEITO DO AINT 4 SOBRE A VIABILIDADE DE PLAQUETAS

Das concentrações avaliadas do AINT 4 (18,75 μM a 300 μM), nenhuma apresentou diminuição significativa da viabilidade plaquetária, em relação ao controle negativo, como mostra a Figura 8. Sugerindo ausência de efeito tóxico sobre as plaquetas humanas.

Figura 8 - Efeito tóxico do AINT 4 sobre as plaquetas humanas

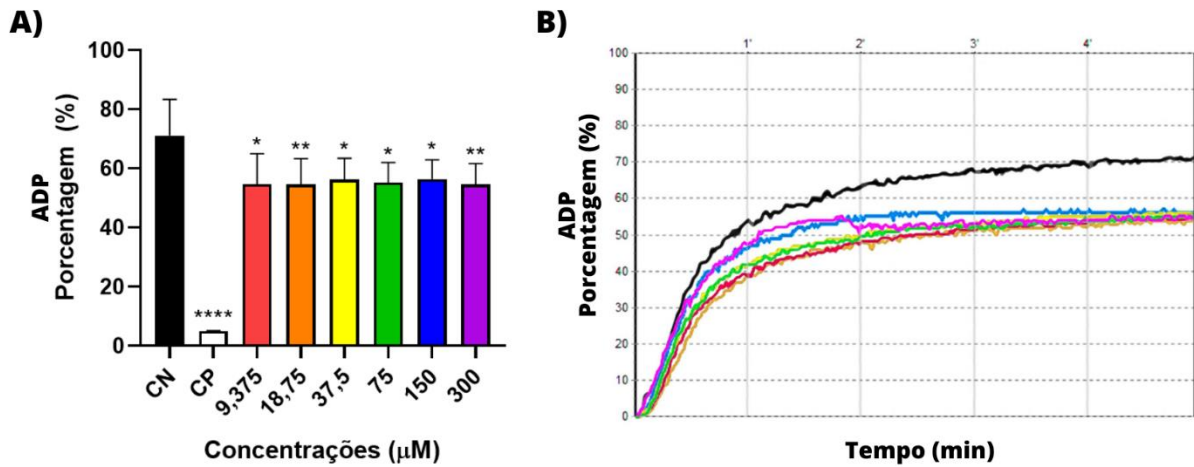


Resultados obtidos do AINT 4 sob a viabilidade das plaquetas. Tratamento com diferentes concentrações do AINT 4 (18,75 à 300 μM) incubada com o PRP, CN = Controle Negativo (DMSO 0,6%) e CP = Controle Positivo (Triton x 100). *Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor $\leq 0,05$). (****) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor $< 0,0001$). Fonte: O autor

5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIAGREGANTE DO AINT 4

Os resultados obtidos evidenciam que o composto AINT 4 exerceu uma notável inibição sobre a agregação plaquetária induzida tanto por ADP quanto epinefrina, quando comparados ao controle negativo. Considerando as diferentes concentrações testadas com ADP, todas inibiram a agregação, conforme destacado na Figura 9A e 9B, com uma média de inibição de 22,27% de todas as concentrações testadas em comparação ao CN.

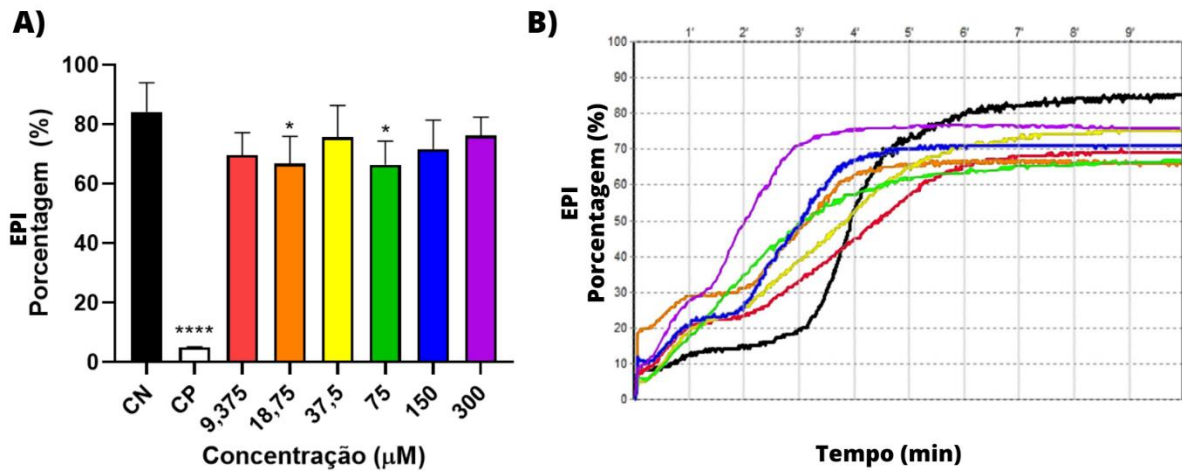
Figura 9 - Efeito do AINT 4 sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP)



Resultado obtido através da indução da agregação plaquetária com diferentes concentrações do AINT4 (9,375 - 300 µM) induzida por 30 µM de ADP por 5 minutos. CN = controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO 0,6%); CP = controle positivo (Ticlopidina 10 µM). Os testes foram realizados em triplicata. (*) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor ≤ 0,05). (**) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor < 0,01). (****) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor < 0,0001) Fonte: O autor

No uso da epinefrina como agonista, os resultados demonstraram uma inibição média de 17,47% de todas as concentrações testada em comparação ao CN, no entanto, algumas concentrações indicaram inibição significativa da agregação plaquetária apenas nas concentrações de 18,75 µM e 75 µM, conforme pode ser observado na Figura 10A e 10B. Estas concentrações demonstraram inibições de 21,07% e 20,63%, respectivamente.

Figura 10 - Efeito do AINT 4 sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina



Resultado obtido através da indução da agregação plaquetária com diferentes concentrações do AINT4 (9,375 - 300 µM) induzida por 5 µg/mL de epinefrina por 10 minutos. CN = controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO 0,6%); CP = controle positivo (Ticlopidina 10 µM). Os testes foram realizados em triplicata. (*) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor ≤ 0,05). (****) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor < 0,0001). Fonte: O autor

5.4. ATIVIDADE DO AINT 4 SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Em relação à influência do composto AINT 4 na coagulação sanguínea, conforme destacado na Tabela 3, foi possível observar que somente a concentração de 18,75 µM demonstrou um aumento significativo do TP em comparação com o grupo controle negativo.

Tabela 3 - Efeitos do AINT 4 sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

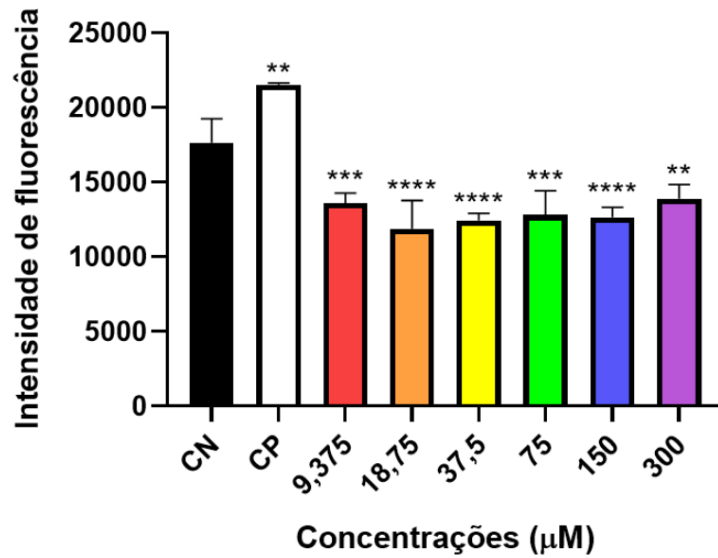
Tratamento	TP		TTPa	
	Tempo \pm DP	RNI	Tempo \pm DP	Relação
Controle Padrão	14 \pm 0,3	-	27,8 \pm 2,2	-
Controle Positivo	> 100	-	> 100	-
Controle Negativo	14,8 \pm 0,15	1,05	25,9 \pm 1,5	0,93
9,375μM	14,5 \pm 0,8	1,03	27,2 \pm 4,6	0,98
18,75μM	17,1 \pm 1*	1,21*	29,2 \pm 0,7	1,05
37,5μM	15,2 \pm 0,5	1,08	28,3 \pm 2,5	1,02
75μM	15,8 \pm 0,9	1,12	29,5 \pm 2	1,06
150μM	16 \pm 0	1,14	27,2 \pm 4,6	0,98
300μM	15,9 \pm 0,5	1,13	26,3 \pm 2,4	0,94

DP – desvio padrão; Controle negativo – DMSO 0,6% (v/v); Controle positivo – heparina 17 UI/mL de sangue total; RNI – razão normalizada internacional. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. *Aumento significativo em relação ao controle negativo (P-valor \leq 0,05). Fonte: O autor

5.5. ATIVIDADE DO AINT 4 NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) POR PLAQUETAS

Os resultados obtidos indicaram uma redução significativa na produção de EROs em todas as concentrações testadas em comparação com o controle negativo. Em média, houve uma inibição de 27% para todas as concentrações testadas, como visto na Figura 11. Notavelmente, a concentração de 18,75 μ M mostrou-se particularmente promissora, com uma inibição de 32% na liberação de EROs.

Figura 11 - Efeito do AINT 4 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)



Resultados obtidos através do ensaio de conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio usando DCFH-DA. Intensidade de fluorescência em CN= controle negativo (DMSO 0,6%), CP = controle positivo (H_2O_2) e AINT 4 (9,375 - 300 μM). (**) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor < 0,01). (***) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor < 0,001). (****) Diferença significativa em relação ao controle negativo (P-valor < 0,0001).

6. DISCUSSÃO

Hemostasia é o processo responsável por manter o fluxo sanguíneo em equilíbrio nas condições normais e prevenir perdas excessivas de sangue após lesões nos vasos (Carmen et al., 2019). E, assim, esse equilíbrio entre a coagulação e a prevenção de coágulos é essencial para a hemostasia saudável (Zaidi; Green, 2019).

Esses processos podem não funcionar corretamente, podendo ocorrer a formação de trombos inapropriados, conhecidos como trombose (Ma et al., 2020). A trombose ocorre quando ocorre uma coagulação excessiva em um vaso sanguíneo e é frequentemente associada a doenças cardiovasculares (Moumneh; Penaloza; Roy, 2018).

Apesar dos medicamentos antitrombóticos serem usados há muito tempo e apresentarem mostrado eficácia em reduzir a mortalidade relacionada a várias doenças cardiovasculares, eles possuem suas limitações (Mcfadyen; Schaff; Peter, 2018). Portanto, é importante continuar realizando estudos para encontrar compostos naturais e/ou sintéticos que possam ajudar na prevenção e tratamento dessas doenças. Com isso, o presente estudo investigou a ação do AINT 4 sobre a hemostasia humana.

Produtos naturais desempenham um papel importante no desenvolvimento de medicamentos, devido à riqueza de compostos secundários com atividades biológicas promissoras (Atanasov, 2021). As neolignananas, encontradas predominantemente em fontes naturais, possuem uma variedade de efeitos biológicos, incluindo atividades antitumorais, antivirais, hepatoprotetoras, diuréticas e contra a tripanossomíase (Silva-Filho et al., 2008; Singh et al., 2014). Devido à sua diversidade de ações biológicas, as neolignananas tetrahidrofuranicas são estruturas de destaque na pesquisa da química medicinal (Welsch et al., 2010).

Neste estudo, utilizamos testes *in silico* para prever parâmetros preditivos, como absorção e distribuição de substâncias. Isso foi feito seguindo a "Regra dos Cinco" de Lipinski, que estabelece que substâncias têm maior probabilidade de serem bem absorvidas quando possuem menos de cinco doadores de hidrogênio, menos de dez receptores de ligação de hidrogênio, peso molecular abaixo de 500 g/mol e um valor de Log P inferior a 5 (Lipinski et al., 1997). Isso ajuda a prever a eficácia de substâncias administradas por via oral.

Segundo a Tabela 1 a molécula AINT 4, ela possui peso molecular 341,36 g/mol, Log P 3,38, 6 receptores de ligação de hidrogênio e 0 doadores de ligação de hidrogênio, confirmando uma boa absorção e permeabilidade, exibindo nenhuma violação. Portanto, é plausível considerar que esse composto contém um potencial biodisponibilidade oral teoricamente promissora.

Além da avaliação de sua biodisponibilidade oral, também foi analisada a análise teórica da toxicidade desses compostos com base em suas estruturas. Levando em consideração que são futuros fármacos destinados à administração oral, a minimização de atividade tóxica significativa e a redução de efeitos adversos são cruciais. Conforme ilustrado na Tabela 2, o composto AINT 4 demonstra uma predição teórica encorajadora em relação à toxicidade, uma vez que todos os parâmetros avaliados exibiram baixo risco.

Estudos realizados demonstraram que análogos triazólicos derivados de neolignanas, semelhantes ao AINT 4, demonstraram baixa citotoxicidade à células mamíferas (Costas *et al.*, 2016). Além disso, um outro análogo isoxazólico clorado, derivado de neolignanas tetrahidrofuranicas, demonstrou um perfil não-mutagênico em experimentos conduzidos com cepas de *Salmonella typhimurium* (Neves *et al.*, 2023). Essas descobertas realçam o potencial não-tóxico do composto AINT 4 tornando-os possíveis agentes farmacológicos promissores.

Com o propósito de avaliar o potencial de toxicidade dos compostos em relação às plaquetas humanas, foi conduzido o teste de viabilidade plaquetária utilizando o Azul de Trypan. Desse modo, como visto na Figura 8, o composto AINT 4 não apresentou uma redução significativa no número de plaquetas viáveis, o que sugere uma baixa toxicidade em relação a essas células sanguíneas. É válido mencionar que, em indivíduos saudáveis, a contagem plaquetária normalmente varia entre 150 a 350 x 10⁹ plaquetas por litro de sangue. Portanto, mesmo no caso em que 5% das plaquetas tenham sofrido deterioração, essa porcentagem não é suficiente para causar impacto significativo nos ensaios de agregação plaquetária, as quais foram realizadas anteriormente (Gremmel; Frelinger; Michelson, 2016).

O composto AINT 4, quando avaliado quanto à sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, demonstrou diminuição significativa nas concentrações testadas em ambos agonistas, como pode ser observado na Figura 9 e 10. Utilizando o agonista ADP, a concentração mais eficaz proporcionou uma redução de 23,38% em relação ao grupo controle negativo (CN). Além disso, quando a agregação foi

induzida por epinefrina (EPI), a concentração mais eficaz (75 μM) resultou em uma redução de 21,07% em relação ao CN.

Estudos realizados por Kang e colaboradores (2013) concluíram que o mecanismo inibitório da neolignana de *Myristica fragrans* (Eritro-acetoxi-tetrametoxi-neoligna) na agregação plaquetária envolve o aumento dos níveis de AMPc e subsequente inibição da mobilização intracelular de Ca^{2+} . Isso interfere em uma via de sinalização comum, o que pode explicar o potencial de inibição do AINT 4 tanto na agregação induzida por ADP quanto por EPI.

Adicionalmente, 10 lignanas da planta *Justicia procumbens*, que demonstraram alta afinidade pelas plaquetas humanas, inibiram a agregação plaquetária ao afetar as vias de sinalização Gq-PLC-PKC e Gi-PI3K-MAPK. Considerando que os receptores de ADP PAR1, PAR4, PAFR e P2Y12 regulam a via de sinalização Gi, assim como o receptor adrenérgico $\alpha 2\text{A}$ presente na membrana plaquetária, além do receptor de ADP P2Y1 que regula a sinalização Gq (Liu *et al.*, 2022). Portanto, esse achado sugere a possibilidade de outro mecanismo de inibição do AINT 4.

Como anteriormente mencionado, o AINT 4 aumentou significativamente o TP apenas na concentração de 18,75 μM em comparação com o grupo controle negativo, como visto na Tabela 4. Entretanto, não houve alteração significativa no TTPa.

O teste para avaliar o TP é utilizado para analisar a via extrínseca da cascata de coagulação, que inclui o fator tecidual que ativará o Fator VII, tendo o fator ativado VII como catalisador da via comum do fator X, para iniciar a formação da fibrina (Austin, 2017).

Uma vez que a neolignana de *Myristica fragrans* demonstrou inibir a mobilização intracelular de Ca^{2+} e, considerando que o cálcio iônico é um componente essencial da cascata de coagulação (Kang; Min; Lee, 2013). O cálcio desempenha um papel essencial na via extrínseca da cascata de coagulação e em todo o processo de coagulação sanguínea (Austin, 2017). O cálcio atua como um cofator necessário para a ativação de várias proteínas envolvidas na coagulação. A saber, a presença do cálcio é essencial para a ativação do Fator VII, além do cálcio auxiliar na ativação da trombina e para a conversão do fibrinogênio em fibrina.

A exposição das plaquetas ao AINT 4 em diferentes concentrações resultou em uma redução na produção de EROs em comparação com o controle negativo (Figura 11). As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel significativo na formação de trombos quando as plaquetas estão ativadas (Qiao *et al.*, 2018). Essas

espécies têm o efeito de modificar a função das mitocôndrias e intensificar a ativação das plaquetas (Masselli *et al.*, 2020), levando a uma hiperativação plaquetária, que pode resultar na formação excessiva de coágulos e complicações tromboembólicas.

No entanto, observou-se que o AINT 4 demonstrou uma redução significativa na geração de EROs. Esse achado sugere a possibilidade de um mecanismo de ação antiagregante plaquetária do AINT 4. Portanto, esta é uma descoberta essencial, pois aponta a capacidade do AINT 4 em diminuir a hiperativação das plaquetas, sendo assim, inibindo a agregação plaquetária.

7. CONCLUSÃO

O AINT 4 demonstrou uma notável inibição da agregação plaquetária em diferentes concentrações com ambos os agonistas utilizados, principalmente com o ADP. Quanto à coagulação, apenas uma concentração apresentou uma mudança significativa no TP. Adicionalmente, o AINT 4 não exibiu toxicidade sobre as plaquetas humanas, e os testes preditivos revelaram baixa toxicidade e boa biodisponibilidade oral. Além de seu efeito na ativação plaquetária, comprovado pela redução na produção de EROs, o qual parece indicar um possível mecanismo de ação antiagregante plaquetário do AINT 4.

Portanto, esses resultados evidenciam uma promissora contribuição do AINT 4 na pesquisa para novas terapias antitrombóticas, assim como fornecem uma base sólida para pesquisas futuras envolvendo análogos derivados de neolignanas tetrahidrofurânicas.

REFERÊNCIAS

- ALBRICKER, Ana Cristina L., *et al.* Diretriz Conjunta sobre Tromboembolismo Venoso – 2022. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, n. 4, p 797–857, 2022.
- ALFADDA, Assim A. *et al.* Reactive oxygen species in health and disease. **BioMed research international**, v. 2012, 2012.
- AUSTIN, Steven K.. Haemostasis. **Medicine**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 204-208, 2017.
- ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.
- BAYIR, Hülya. Reactive oxygen species. **Critical care medicine**, v. 33, n. 12, p. S498-S501, 2005.
- BIFTU, Tesfaye *et al.* Conformation and Activity of Tetrahydrofuran Lignans and Analogues as Specific Platelet Activating Factor Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1917-1928, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Informática do SUS (Datasis)**. Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def> Acesso em: 01/10/2022
- CAMPOS, Kevin R. *et al.* The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, v. 363, n. 6424, p. 527-532, 2019.
- CARMEN, Rodríguez Dávila S. *et al.* Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica. **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, Guadalajara, p. 227-233, 2019.
- CHEN, Qishan *et al.* Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 8, p. 1279-1292, 2018.
- COSTA, Eduarda C. *et al.* Antileishmanial activity and structure-activity relationship of triazolic compounds derived from the neolignans grandisin, veraguensin, and machilin G. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 802, 2016.
- DUNN, Steven P.; MACAULAY, Tracy E. Drug-drug interactions associated with antiplatelet therapy. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 231-240, 2011.
- FRYDMAN, G.H.; PATE, K.A. Metcalf; VITSKY, A.. Platelets and Hemostasis. **Comprehensive Toxicology**, [S.L.], p. 60-113, 2018.
- GUPTA, Ryan *et al.* A Comprehensive Review on Antithrombotic Therapy for Peripheral Artery Disease. In: **Seminars in Vascular Surgery**. WB Saunders, 2022.

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, 2015

HALEY, Kristina M.; RECHT, Michael; MCCARTY, Owen JT. Neonatal platelets: mediators of primary hemostasis in the developing hemostatic system. **Pediatric research**, v. 76, n. 3, p. 230-237, 2014.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

JENNE, Craig N.; URRUTIA, R.; KUBES, P.. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **International Journal Of Laboratory Hematology**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 254-261, 2013.

JOHARI, Vandita; LOKE, Chandravathi. Brief overview of the coagulation cascade. **Disease-a-month**, v. 58, n. 8, p. 421-423, 2012.

KANG, Jung Won; MIN, Byung-Sun; LEE, Jeong-Hyung. Anti-platelet Activity of Erythro-(7S, 8R)-7-acetoxy-3, 4, 3', 5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan from *Myristica fragrans*. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 11, p. 1694-1699, 2013.

KAZMI, Rashid S.; BOYCE, Sara; LWALEED, Bashir A. Homeostasis of Hemostasis: the role of endothelium. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**, [S.L.], v. 41, n. 06, p. 549-555, 2015.

KUBATKA, Peter *et al.* Antithrombotic and antiplatelet effects of plant-derived compounds: a great utility potential for primary, secondary, and tertiary care in the framework of 3P medicine. **EPMA Journal**, p. 1-25, 2022.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, Bo *et al.* Effective components and mechanism analysis of anti-platelet aggregation effect of *Justicia procumbens* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 294, p. 115392, 2022.

LORGA FILHO, Adalberto M. *et al.* Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, p. 01-95, 2013.

MA, Ning *et al.* Plasma metabonomics and proteomics studies on the anti-thrombosis mechanism of aspirin eugenol ester in rat tail thrombosis model. **Journal of proteomics**, v. 215, p. 103631, 2020.

MASSELLI, Elena *et al.* ROS in platelet biology: functional aspects and methodological insights. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 14, p. 4866, 2020.

MATTHEIJ, Nadine J. *et al.* Coated platelets function in platelet-dependent fibrin formation via integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and transglutaminase factor XIII. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 427-436, 2016.

MCFADYEN, James D.; SCHAFF, Mathieu; PETER, Karlheinz. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 3, p. 181-191, 2018.

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, 2015.

MOUMNEH, T.; PENALOZA, A.; ROY, P.M.. Trombosis venosa profunda. **Emc - Tratado de Medicina**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-6, 2018.

NAGY, Magdolna *et al.* Variable impairment of platelet functions in patients with severe, genetically linked immune deficiencies. **Haematologica**, v. 103, n. 3, p. 540-549, 2018.

NEVES, Amarith R. *et al.* In Vivo Antileishmanial Effect of 3, 5-Diaryl-isoxazole Analogues Based on Veraguensin, Grandisin, and Machilin G: A Glance at a Preclinical Study. **ACS Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1150-1159, 2023.

NEVES, Amarith R. *et al.* Effect of isoxazole derivatives of tetrahydrofuran neolignans on intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: A structure–activity relationship comparative study with triazole-neolignan-based compounds, **Chemical Biology and Drug Design**, v. 94, p. 2004–2012, 2019.

NICOLAU, Jose C. *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST – 2021. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 117, n. 1, p. 181-264, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Cardiovascular diseases**. Jun 2021. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 07 ago. 2022.

QIAO, Jianlin *et al.* Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. **Redox biology**, v. 14, p. 126-130, 2018.

REINIERS, M.J. *et al.* Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays, **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 3853-3857, 2017.

RODRIGUES, Evandra 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.

SECA, Ana ML; PINTO, Diana CGA. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 2018.

- SEPÚLVEDA, Cesar; PALOMO, Iván; FUENTES, Eduardo. Primary and secondary haemostasis changes related to aging. **Mechanisms of ageing and development**, v. 150, p. 46-54, 2015.
- SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
- SIES, Helmut *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 499-515, 2022.
- SILVA-FILHO, Ademar A. *et al.* *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p.1307–1310, 2008.
- SINGH, Nisha *et al.* Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014.
- SYSAK, Angelika; OBMINSKA, Bożena Mrukowicz. Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 137, p. 292-309, 2017.
- THOMAS, Steven G. The Structure of Resting and Activated Platelets. **Platelets**, [S.L.], p. 47-77, 2019.
- TREFZGER, Ozildeia S. *et al.* Design, synthesis and antitrypanosomatid activities of 3,5-diaryl- isoxazole analogues based on neolignans veraguensin, grandisin and machilin G. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 93, p. 313–324, 2019.
- VAN DER MEIJDEN, Paola E.; HEEMSKERK, Johan W. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, p. 166 a 179, 2019.
- VEBER, Daniel F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.
- VILAHUR, Gemma *et al.* Intracellular platelet signalling as a target for drug development. **Vascular pharmacology**, v. 111, p. 22-25, 2018.
- WEBER, Simone S. *et al.* Chemical profile, antimicrobial potential, and antiaggregant activity of supercritical fluid extract from *Agaricus bisporus*. **Chemical Papers**, v. x, 1-10, 2022.
- WELSCH, Matthew E. *et al.* Privileged scaffolds for library design and drug discovery. **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 3, p. 347-361, 2010.
- ZAIDI, Abbas; GREEN, Laura. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 152-158, 2019.

ZALESK, Frantisek; BON, David Jean-Yves Denis; POSPÍSIL, Jirí. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, v. 146, p. 104284, 2019.

ZHU, Jie *et al.* The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3065-3075, 2018.

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: 66042722.8.0000.0021

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 - Pioneiros - Prédio das Pró-Reitorias - Hércules Maymone - 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.835.526

individuais 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 - Pioneiros   Prédio das Pr -Reitorias   Hércules Maymone   1  andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.835.526

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_PROJETO_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	folhaderosto_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 das Pró-Reitorias, Hércules Maymone, 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



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	Orcamento.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 Pr -Reitorias   Hércules Maymone   1  andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.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: _____