

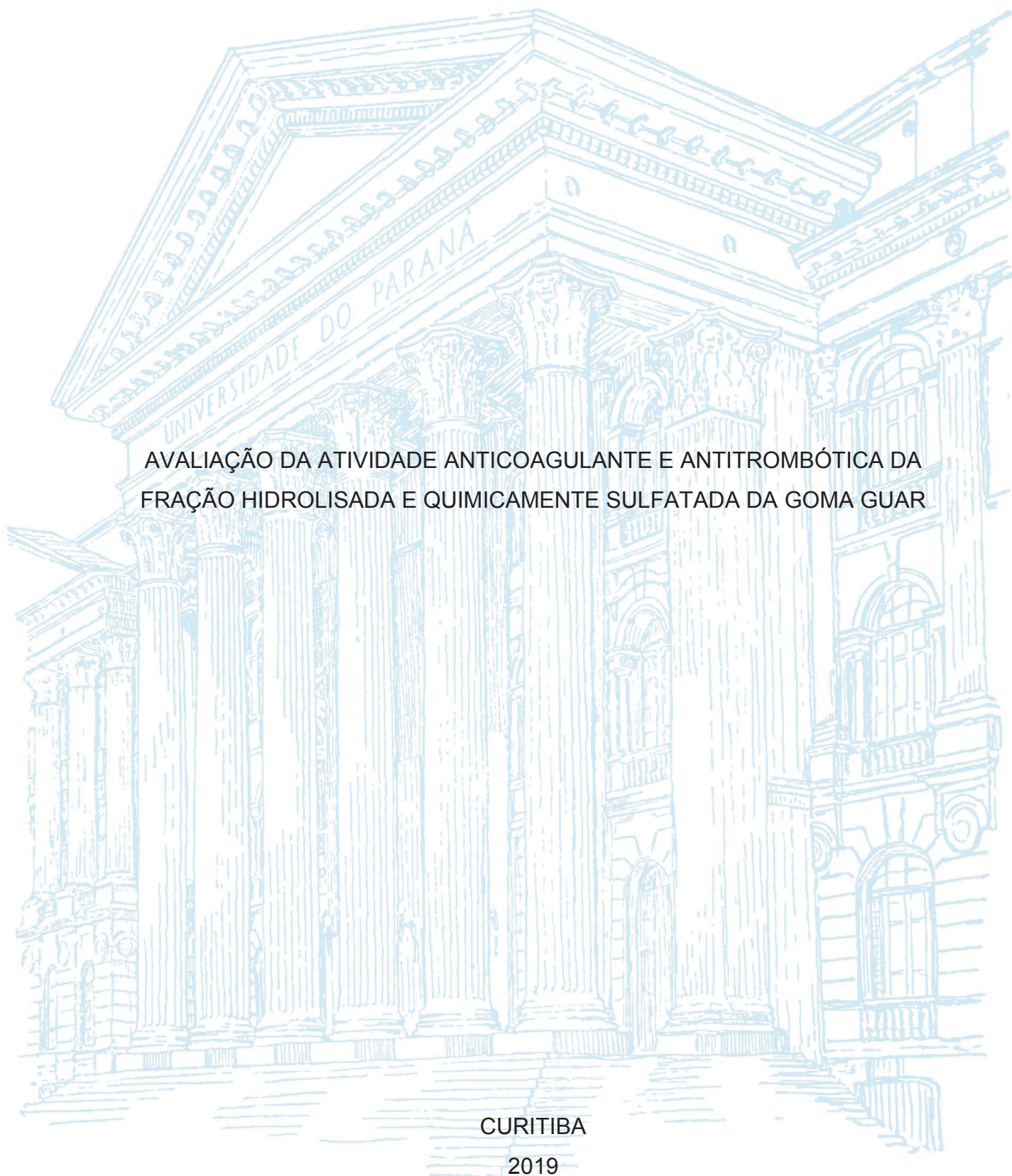
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELYN PRISCILA DE OLIVEIRA BARDDAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DA
FRAÇÃO HIDROLISADA E QUIMICAMENTE SULFATADA DA GOMA GUAR

CURITIBA

2019



HELYN PRISCILA DE OLIVEIRA BARDDAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DA
FRAÇÃO HIDROLISADA E QUIMICAMENTE SULFATADA DA GOMA GUAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Barddal, Helyn Priscila de Oliveira

Avaliação da atividade anticoagulante e antitrombótica da fração hidrolisada e quimicamente sulfatada da goma guar. / Helyn Priscila de Oliveira Barddal. – Curitiba, 2019.

96 p.: il.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Goma guar - Indústria 2. Polissacarídeos 3. Anticoagulantes 4. Fibrinolíticos I. Título II. Cipriani, Thales Ricardo III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.1924



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 400010160 33P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **HELYN PRISCILA DE OLIVEIRA BARDDAL** intitulada: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DA FRAÇÃO HIDROLISADA E QUIMICAMENTE SULFATADA DA GOMA GUAR**, sob orientação do Prof. Dr. THALES RICARDO CIPRIANI, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Agosto de 2019.

THALES RICARDO CIPRIANI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

EDVALDO DA SILVA TRINDADE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

PATRICIA MARIA STUELPE CAMPELE

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

GUILHERME LANZI SASSAKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a todos aqueles que de modo direto e indireto fizeram com que ele fosse possível.

À minha família, meu marido Carlos e meus schnauzers, Deby e Ted. Vocês são minha alegria e meu porto seguro. Por mais momentos difíceis que passamos nesse período, sempre nos apoiamos e caminhamos lado a lado. Todas as lágrimas foram bem acolhidas e por fim, sempre um sorriso por estarmos juntos durante as batalhas que a vida nos impôs. O apoio, orgulho e admiração que recebi e recebo de vocês, refletem no desenvolvimento do meu trabalho e da minha pessoa.

Aos meus pais, José e Delma, que mesmo não entendendo perfeitamente o que eu faço ou porque eu faço, sempre mostram um brilho de orgulho e de amor no olhar. Um contentamento incomensurável de pais para filha foi o que sempre recebi.

Aos meus irmãos, que não poderia deixar de exaltar pela destreza que cada um possui em ser perfeitos e imperfeitos na função de irmão. Meus agradecimentos por entenderem que evoluímos, amadurecemos e melhoramos. E, que para esse processo acontecer precisamos de suporte, suporte dado por vocês, meus pilares, de maneira impecável. Everton, Everlin, Everson e Helenize Barddal, obrigada pelo incentivo, preocupação e simplesmente por serem vocês.

Aos amigos que conquistei desde o início da Pós-Graduação e que tenho como parte da família Willian Meira, Janaína Gomes Heuko, Gislaine Cristina dos Santos e Glaucio Dias. Vocês me ensinaram muito do que é preciso para se viver feliz, um pouco de música, cor e boas risadas.

Aos amigos que passaram pelo laboratório, para um café ou para desenvolver um projeto, Carolina Lopes Leivas, Larry Ladislau, Elaine Kiatkoski, Yony Román Ochoa, Pedro Chaves, Giuliana Cozzella, Atamai Moraes, Franciê Melo de Assis, Ana Flávia de Oliveira.

A todos do Grupo de Química de Carboidratos que sem dúvida tornaram cada dia especial no térreo escuro da Bioquímica. Aprender a admirar o trabalho de cada um de vocês foi fácil, vendo a dedicação e presteza que mostravam em cada ensinamento e conquista de resultado. Em especial ao Arquimedes Santana que muito antes de eu conhecer a Pós-Graduação, já me apresentava algumas maravilhas dela com o valioso RMN. Sempre me ajudou e me ajuda em muitos aspectos.

Ao Professor e orientador Thales Ricardo Cipriani, que graças a Deus tive a oportunidade de conhecer e trabalhar junto. Sempre um ser magnífico e que deveria ser copiado por muitos outros. Um exemplo de comprometimento, honestidade, justiça e virtuosidade.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e às agências de fomento (CAPES e CNPq) que permitiram e contribuíram para minhas atividades laboratoriais.

A todos aqueles de fora do Departamento que influenciaram ou participaram do meu desenvolvimento pessoal, profissional ou do projeto. Professora Fernanda Simas (Biologia Celular - UFPR), Olair Beltrame (Hospital Veterinário - UFPR), Israel (Laboratório de Microscopia Confocal -UFPR), Maria Carolina Stipp (Departamento de Farmacologia - UFPR), Professora Alexandra Acco (Departamento de Farmacologia UFPR) e Luana (Biotério - UFPR).

Por fim, agradeço imensamente aos que mesmo sendo de fora do âmbito da Universidade mantiveram o objetivo, às vezes sem saber, de me manter ocupada, relaxada e feliz com muitas reuniões, encontros, festas temáticas, saídas noturnas, *soccer*, *flag* e futebol americano. Foram nesses grupos e momentos vividos com eles que encontrei amor, respeito e confiança que eu procurava para me manter sã e completa. A vocês meu respeito e gratidão: Galera do Bem, Estrelas Vip, Las Usurpadoras, Futebol Charme, Fute de Segunda, Fute de Quarta, Aurea e Curitiba Silverhawks.

NOTA EXPLICATIVA

Esta tese está estruturada na forma de artigo segundo as normas do Programa de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica e do Sistema de Bibliotecas (SiBi) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A tese contém introdução, revisão bibliográfica, justificativa, objetivos, artigos científicos, conclusões, referências e anexos. Os artigos científicos incluem revisão bibliográfica, materiais, metodologias, resultados, discussão de resultados e referências.

RESUMO

A heparina é um glicosaminoglicano de escolha como agente anticoagulante durante processos de coleta de sangue para fins de análises hematológicas e bioquímicas e também clinicamente, como o principal agente de escolha no tratamento de distúrbios hemostáticos. Essencialmente ela atua como agente anticoagulante e antitrombótico por interagir, principalmente por meio dos grupos sulfato, com proteínas inibidoras da cascata de coagulação, intensificando seus potenciais de inibição. Embora eficaz, a utilização da heparina, que é extraída de fonte animal, tem limitações, principalmente porque o seu efeito anticoagulante é imprevisível, acarretando alto risco de sangramento e episódios de trombocitopenia. Devido a estas razões, busca-se a obtenção de agentes anticoagulantes e antitrombóticos alternativos à heparina, incluindo polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi obter um agente anticoagulante e antitrombótico de origem não animal, potencialmente seguro e de fácil e ampla obtenção. Agente esse capaz de ser utilizado como anticoagulante em coletas laboratoriais de sangue para fins de análises hematológicas e bioquímicas, com ação quando aplicado por via subcutânea e seguro quando usado continuamente. Portanto, para atingir esses objetivos, o polissacarídeo da goma guar comercial foi submetido à hidrólise ácida parcial e sulfatação química. A goma guar (GG) é uma galactomanana amplamente utilizada na indústria como espessante, aglutinante e emulsificante. Nossos estudos com GG parcialmente hidrolisada e quimicamente sulfatada (hGGSL) mostraram que esta molécula é uma galactomanana com M_w de 10,2 kDa e DS de 1,91. Comparada com a atividade da heparina não fracionada *in vitro* por aPTT, a heparina se mostrou apenas 4,5x mais eficiente que hGGSL e ambas atividades foram inibidas na presença de protamina. Seu mecanismo de ação se mostrou dependente de serpina, assim como a heparina. *In vivo*, hGGSL foi prontamente absorvido quando administrado por via subcutânea e eficaz na redução da trombose venosa. Quando investigados os efeitos do uso contínuo por 14 dias de hGGSL em ratos, os resultados hematológicos, bioquímicos e histológicos mostraram uma molécula potencialmente segura, não desencadeando respostas inflamatórias. Contudo, hGGSL não se mostrou eficiente como anticoagulante para coleta de sangue, pois foram observadas algumas alterações nos parâmetros hematológicos e na maioria dos parâmetros bioquímicos. Desta forma, hGGSL mostrou um grande potencial como molécula candidata a agente anticoagulante e antitrombótico para uso *in vivo*.

Palavras chave: Goma guar. Polissacarídeo. Galactomanana. Sulfatação química. Anticoagulante. Antitrombótico.

ABSTRACT

Heparin is a glycosaminoglycan choices of anticoagulant agent in laboratories during blood collection processes for hematologic and biochemical analysis and also clinically, as the main agent of choice in the treatment of haemostatic disorders. It essentially acts as an anticoagulant and antithrombotic agent by interacting, mainly through the sulfate groups, with coagulation cascade inhibitors proteins, intensifying their inhibition potentials. Although effective, the use of heparin, which is extracted from animal source, has limitations, mainly because its anticoagulant effect is unpredictable, leading to high risk of bleeding and episodes of thrombocytopenia. Due to these reasons, An alternative anticoagulant and antithrombotic agent to heparin is sought, including naturally or chemically sulphated polysaccharides. Therefore, the objective of this study was to obtain an anticoagulant and antithrombotic agent of non-animal origin, potentially safe and easy to obtain. This agent can be used as an anticoagulant in laboratory blood collection for the purpose of biochemical haematologic analysis, with action when applied by subcutaneous route and safe when used continuously *in vivo*. Therefore, to achieve these objectives, the guar commercial gum polysaccharide was subjected to partial acidic hydrolysis chemical disulfation. Guar gum (GG) is a galactomanana widely used in the industry as a thickener, binder and emulsifier. Our studies with partially hydrolyzed and chemically sulfated GG (hGGSL) showed that this molecule is a galactomanan with 10.2 kDa M_w and DS of 1.91. Compared with *in vitro* unfractionated heparin activity by aPTT, heparin was only 4.5x more efficient than hGGSL and both activities were inhibited in the presence of protamine.. Its mechanism of action was shown to be dependent on deserpin, as well as heparin. hGGSL was readily absorbed when administered subcutaneously and effective *in vivo* venous thrombosis reduction. When investigating the effects of continuous 14-day use of hGGSL on rats, hematological, biochemical and histological results showed a potentially safe molecule, not eliciting inflammatory responses. However, hGGSL was not shown to be effective as an anticoagulant for blood collection, since some alterations were observed in hematological parameters and in most biochemical parameters. In this way, hGGSL has shown great potential as a candidate molecule anticoagulant and antithrombotic agent for use *in vivo*.

Keywords: Gum guar. Polysaccharide. Galactomannan. Chemical sulfation. Anticoagulant. Antithrombotic.

LISTA DE FIGURAS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - GATILHOS DE TROMBOSE ARTERIAL E VENOSA	21
FIGURA 2 - MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO	25
FIGURA 3 - ANTICOAGULANTES X CACATA DE COAGULAÇÃO	26
FIGURA 4 - MODELO DE HEMOSTASIA BASEADO NA CÉLULA.....	28
FIGURA 5 - VISÃO GERAL DOS TESTES DE COAGULAÇÃO	31
FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS UNIDADES MAJORITÁRIAS E MINORITÁRIAS DA HEPARINA.....	36
FIGURA 7 - COMPLEXO TERNÁRIO HEPARINA/ANTITROMBINA/SERINO PROTEASE.....	37
FIGURA 8 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA À ANTITROMBINA	38
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA GOMA GUAR (GG).....	45

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO I

FIGURE 1 - HPSEC elution profiles of the non-sulfated and sulfated polysaccharides.....	57
FIGURE 2 - Effect of the sulfated polysaccharides on aPTT of citrated sheep plasma.....	58
FIGURE 3 - Effect of protamine on the anticoagulant activity of hGGSL	59
FIGURE 4 - Effect of hGGSL on FIIa (a) and FXa (b) activities	60
FIGURE 5 - <i>In vivo</i> antithrombotic effect of hGGSL.....	61
FIGURE 6 - <i>Ex vivo</i> aPTT after subcutaneous administration of hGGSL	62
FIGURE 7 - ¹³ C/ ¹ H-HSQC analysis.....	64

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO II

FIGURE 1 - Plasma level of acute phase proteins of rats treated with PBS or hGGSL subcutaneously for 14 days.....	79
FIGURE 2 - Weight of organs of rats treated with PBS or hGGSL subcutaneously for 14 days.....	79
FIGURE 3 - Representative histological analysis of the liver of rats treated with PBS or hGGSL.....	80

LISTA DE TABELA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - FATORES DE COAGULAÇÃO.....	23
TABELA 2 - AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS.....	32

LISTA DE TABELA - ARTIGO I

TABLE 1 - Profile of O-methylated alditol acetates obtained by methylation analysis of GG, hGG e hGGSL.	63
--	----

LISTA DE TABELA - ARTIGO II

TABLE 1 - Complete blood count of rat's blood collected with heparin or hGGSL	74
TABLE 2 - Biochemical analyses of rat's blood collected with heparin or hGGSL.....	75
TABLE 3 - Complete blood count of rats subcutaneously treated with pbs or hGGSL for 14 days.....	77
TABLE 4 - Biochemical analyses of rats treated with pbs or hGGSL subcutaneously for 14 days.....	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 HEMOSTASIA.....	20
2.1.1 Distúrbios Hemostáticos	20
2.1.2 Trombose Arterial	21
2.1.3 Tromboembolismo Venoso	21
2.2 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	23
2.2.1 Modelo Clássico da Coagulação Sanguínea	23
2.2.1.1 Via Extrínseca	24
2.2.1.2 Via Intrínseca.....	24
2.2.1.3 Via Comum.....	25
2.2.2 Modelo de Hemostasia Baseado na Célula	26
2.2.2.1 Fase de Iniciação.....	27
2.2.2.2 Fase de Amplificação	27
2.2.2.3 Fase de Propagação	28
2.3 SISTEMA ANTICOAGULANTE NATURAL	28
2.3.1 Antitrombina.....	29
2.3.2 Cofator II da Heparina.....	29
2.3.3 Fibrinólise	29
2.4 COAGULAÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
2.5 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS	31
2.5.1 Anticoagulantes Naturais	33
2.5.2 Anticoagulantes Orais.....	34
2.5.3 Anticoagulantes Parenterais	34
2.5.3.1 Heparina	35
2.5.3.2 Mecanismo de Ação da Heparina.....	36
2.5.3.3 Limitações do Uso da Heparina.....	38
2.5.3.4 Heparina de Baixa Massa Molecular	38
2.6 PROTAMINA	39
2.7 HEPARINA COMO ANTICOAGULANTE PARA COLETA DE SANGUE	40
2.8 POLISSACARÍDEOS NATURALMENTE OU QUIMICAMENTE SULFATADOS ALTERNATIVOS À HEPARINA	41

2.9 GOMA GUAR.....	44
3. JUSTIFICATIVA.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
4.1. OBJETIVO GERAL.....	47
4.1.1. Objetivos específicos.....	47
ARTIGO I.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUCTION.....	50
2. EXPERIMENTAL.....	51
2.1 MATERIAL.....	51
2.2 METHODS.....	51
2.2.1 Partial hydrolysis.....	51
2.2.2 Chemical sulfation.....	51
2.2.3 Structural analysis of polysaccharides.....	52
2.2.4 Anticoagulant activity.....	54
2.2.5 α -thrombin and factor Xa activities.....	54
2.2.6 Animals.....	55
2.2.7 <i>Ex vivo</i> aPTT.....	55
2.2.8 Venous thrombosis.....	55
2.2.9 Statistical analysis.....	56
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	56
3.1. PRELIMINARY STRUCTURAL ANALYSIS OF POLYSACCHARIDES.....	56
3.2. ANTICOAGULANT ACTIVITY <i>IN VITRO</i> AND MECHANISM OF ACTION.....	57
3.3. ANTITHROMBOTIC ACTIVITY.....	61
3.4. <i>EX VIVO</i> ANTICOAGULANT ACTIVITY.....	61
3.5. SULFATION PATTERN OF hGGSL.....	62
4. CONCLUSIONS.....	64
5. REFERENCES.....	65
ARTIGO II.....	67
ABSTRACT.....	68
1. INTRODUCTION.....	70
2. EXPERIMENTAL.....	71
2.1 MATERIALS.....	71
2.2 METHODS.....	71

2.2.1	Animals	71
2.2.2	Evaluation of hGGSL as anticoagulant in blood collection (blood collection assay).....	71
2.2.3	Continuous use of hGGSL (continuous use assay)	72
2.2.4	Blood count and biochemical analyses	72
2.2.5	ELISA tests for acute phase proteins.....	73
2.2.6	Organs analysis	73
2.2.7	Statistical analysis.....	73
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	74
3.1.	EVALUATION OF hGGSL AS ANTICOAGULANT IN BLOOD COLLECTION (BLOOD COLLECTION ASSAY).....	74
3.1.1.	Blood count.....	74
3.1.2.	Biochemical analyses	75
3.2.	CONTINUOUS USE OF hGGSL (CONTINUOUS USE ASSAY).....	76
3.2.1.	Blood count, biochemical analyses and acute phase proteins	76
3.2.2.	Organ analysis	79
4.	CONCLUSIONS.....	80
5.	REFERENCES.....	81
5.	CONCLUSÕES GERAIS	83
6.	REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO 1 – CEUA 1038	95
ANEXO 2 - CEUA 1137	96

1. INTRODUÇÃO

Após um episódio de lesão vascular, uma série de processos são ativados com a intenção de reparar o dano e reestabelecer o equilíbrio hemostático, ou seja, a fluidez sanguínea. Isso visa estabilizar o dano vascular através da formação de coágulos *in situ*, e sua posterior dissolução. Contudo, pode existir a formação disseminada de coágulos por fatores alheios, ou não, à lesão, o que pode evoluir à quadros tromboembólicos.

Na prevenção de quadros relacionados à hipercoagulação sanguínea, uma das drogas mais utilizadas é a heparina, um polissacarídeo da família dos glicosaminoglicano (MOURÃO; PEREIRA, 1999; CASU, 2005). As heparinas podem ser comercializadas na forma de heparina não fracionadas (UFHs) ou na forma de heparina de baixa massa molar (LMWHs), a qual é proveniente da degradação enzimática ou química controlada das UFHs (FRENCH; FAXON, 2002).

O que confere às heparinas potencial anticoagulante e antitrombótico é sua capacidade de interagir, principalmente por meio dos grupos sulfato, com proteínas inibidoras da cascata de coagulação, intensificando seus potenciais de inibição (BOURIN; LINDAHL, 1993; CASU, 2005).

Apesar da heparina ser o principal medicamento utilizado em casos de hipercoagulação sanguínea, ela pode causar efeitos secundários como, por exemplo, trombocitopenia e reações cutâneas (MENAJOVSKY, 2005; SCHINDEWOLF et al., 2012). Devido a estas observações, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de alternativas à heparina, como aquelas com polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005; CIPRIANI et al., 2009; GRACHER et al., 2010; MAAS et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; BARDDAL et al., 2015; ROMAN et al., 2017).

Além do uso clínico, a heparina também é utilizada como anticoagulante *in vitro*, para viabilizar a coleta de sangue para análises clínicas. Assim, ao mesmo tempo que novos compostos anticoagulantes são estudados para uma aplicação, como forma de medicamento, eles também são estudados quanto ao potencial anticoagulante para uso *in vitro*.

Neste sentido, as gomas vegetais, as quais são abundantes matérias primas industriais, que apresentam biodegradabilidade e biossegurança, são bastante

interessantes para serem utilizadas como protótipo para a obtenção de novos polissacarídeos com propriedades anticoagulantes para uso *in vivo* e/ou *in vitro*.

Entre as muitas gomas vegetais existentes está a goma guar (GG), um polissacarídeo do tipo galactomanana, constituído por unidades de β -manose 1 \rightarrow 4 ligadas, contendo substituições em O-6 por terminais não redutores de α -galactose (PRABAHARAN, 2011; PRAJAPATI et al., 2013), obtida das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, família Leguminosae (YOON et al., 2007).

Naturalmente a goma guar apresenta alta massa molecular e ausência de grupos sulfato em sua estrutura, contudo tem sido demonstrado que esses grupos são fundamentais para os efeitos anticoagulantes e antitrombóticos de diversos polissacarídeos, incluindo a heparina (BARDDAL et al., 2015; ROMAN et al. 2017). Portanto, a degradação parcial e sulfatação química do polissacarídeo da goma guar é necessária para conferir a ele uma menor massa molar e atividade anticoagulante e antitrombótica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HEMOSTASIA

Hemostasia é um processo fisiológico que controla a fluidez do sangue no interior do vaso sanguíneo por meio de ações anticoagulantes e coagulantes. Por exemplo, ela tem o potencial para induzir rapidamente um tampão hemostático, uma massa rica em plaquetas envolto em fibrina, em um vaso sanguíneo danificado, para prender o fluxo de sangue (VINE, 2009). O equilíbrio entre a fluidez e a coagulação é mantido por uma interação complexa entre as plaquetas, o endotélio vascular, a cascata de coagulação e o sistema fibrinolítico (HARTER et al., 2015).

O restabelecimento da hemostasia após uma lesão vascular se dá em dois passos, conhecidos como hemostasia primária e hemostasia secundária. Na hemostasia primária acontecem três importantes mecanismos de controle de perda sanguínea: 1) contração muscular da parede do vaso lesionado; 2) agregação plaquetária com a formação de um tampão plaquetário frouxo; e 3) formação de um trombo estável, a partir da ligação de uma rede de fibrina ao tampão plaquetário (BOZZINI; MOLINAS, 2004; SMITH et al., 2005; EYRE; GAMLIN, 2010). Com a lesão controlada se inicia a hemostasia secundária, processo de cicatrização e dissolução do trombo pelo sistema fibrinolítico (MURRAY et al., 2007; BERNARRO et al., 2013).

2.1.1 Distúrbios Hemostáticos

Normalmente não ocorre ativação das plaquetas nem coagulação nos vasos sanguíneos intactos, mas caso haja um desequilíbrio no sistema hemostático o produto final dessa desordem é a trombose (MACKMAN, 2008). Por outro lado, esse desequilíbrio pode ser antagonista e gerar sangramentos excessivos resultantes da deficiência de qualquer um dos fatores de coagulação sanguínea.

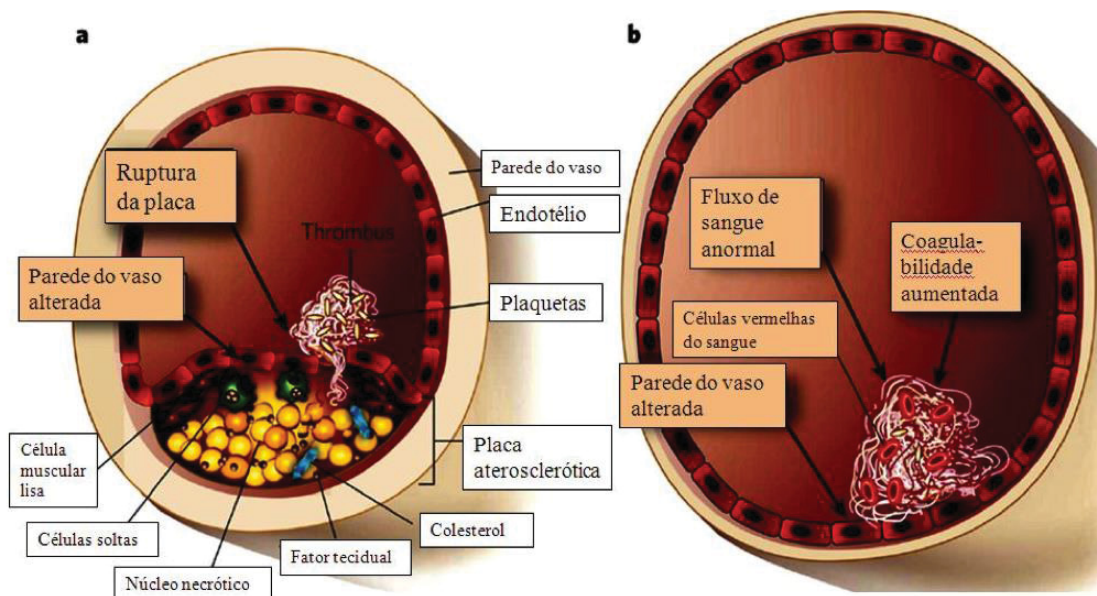
Os sangramentos podem ser causados, dentre outros motivos, por deficiência de vitamina K ou de plaquetas (trombocitopenia). Já a trombose, doença de preocupação mundial, pode ser proveniente de um coágulo anormal que se desenvolva no vaso sanguíneo, sendo esse coágulo chamado de trombo. Esse trombo pode se soltar da parede do vaso e ser carregado pelo fluxo contínuo do

sangue, passando a circular livremente, sendo então chamado de êmbolo. Os êmbolos originados no sistema arterial podem ocluir artérias ou arteríolas no cérebro, nos rins e outros locais. Àqueles originados no sistema venoso, geralmente fluem para o pulmão, provocando a embolia pulmonar (EDELBERG, 2001; GUYTON; HALL, 2006).

2.1.2 Trombose Arterial

O fator desencadeante da trombose arterial é a ruptura de placas de aterosclerose, que se desenvolve pelo acúmulo de lipídeos na parede das artérias. Quando ocorre a ruptura de uma placa, o endotélio vascular é lesionado, recrutando as plaquetas, através da interação destas com o colágeno e com fator de von Willebrand, para o sítio da lesão (Figura 1a) (MACKMAN, 2008).

FIGURA 1 - GATILHOS DE TROMBOSE ARTERIAL E VENOSA



FONTE: Adaptado de MACKMAN (2008).

LEGENDA: **a.** Luz da artéria: O gatilho primário de trombose arterial é a ruptura de uma placa aterosclerótica. Trata-se de ruptura do endotélio e liberação de componentes da placa no lúmen do vaso sanguíneo. **b.** Luz da veia: Em contrapartida, na trombose venosa, o endotélio permanece intacto, mas pode ser convertido de uma superfície com propriedades anticoagulantes para um com propriedades pró-coagulantes.

2.1.3 Tromboembolismo Venoso

No tromboembolismo venoso (TEV) o endotélio permanece intacto, mas pode ser convertido de uma superfície com propriedades anticoagulantes para uma com propriedades pró-coagulantes (Figura 1b) (MACKMAN, 2008). É uma patologia grave de alta incidência mundial, mas classificada como caso de morte evitável entre pacientes hospitalizados.

Algumas das condições predisponentes para o TEV são:

- a) uso de anticoncepcionais ou tratamento hormonal;
- b) tabagismo;
- c) presença de varizes;
- d) obesidade;
- e) cirurgias de médio e grande portes;
- f) traumatismo;
- g) a fase final da gestação ou puerpério;
- h) idade avançada;
- i) câncer;
- j) fraturas ósseas;
- k) infecções.

A estase é também um importante fator predisponente, onde, após a formação inicial do trombo sua evolução se dá pela deposição de mais fibrina, de agregados plaquetários, de leucócitos e de hemácias (MELO et al, 2006; LOZANO, 2003).

Quando não diagnosticada precocemente e tratada adequadamente, o TEV pode evoluir causando sérias complicações, como trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP) (COLMAN, 2006; HEIT, 2008; VEIGA et al., 2013).

A TVP, também conhecida como flebite ou tromboflebite profunda, caracteriza-se pela formação de trombos em veias do sistema profundo. Ela geralmente acomete os membros inferiores, pois nestes o retorno do sangue é dificultado normalmente pela ação gravitacional. Se a circulação sanguínea se torna mais lenta, o sangue tende a estagnar-se, situação ideal para a formação de coágulos (MELLO; DUQUE, 2003; MELO et al., 2006).

A EP é caracterizada pelo desprendimento do trombo das veias profundas e sua migração pela da corrente sanguínea até atingir a artéria pulmonar onde provoca obstrução da circulação e enfarte pulmonar (FRANCO, 2001; LOZANO, 2003).

2.2 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

2.2.1 Modelo Clássico da Coagulação Sanguínea

A coagulação é o processo no qual o sangue perde sua característica de fluido, por meio da geração de um coágulo pela interação das plaquetas, tecido lesado e fibrina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006). Ela consiste na conversão de em uma série de zimogênios, por proteólise, em enzimas ativas (KU; BAE, 2014).

Os fatores de coagulação são, na sua maioria, enzimas do tipo serino proteases. Muitos fatores de coagulação são, comumente, designados por algarismos romanos (Tabela 1). Para indicar sua forma ativa, convencionou-se acrescentar a letra “a” minúscula após o algarismo. O número correspondente a cada fator não reflete a ordem de sequência das reações e sim a ordem com que foram descobertos. A maioria dos fatores de coagulação se apresenta na forma inativa, denominada zimogênio, que quando ativada, provoca reações proteolíticas em cascata no processo de coagulação (GUYTON; HALL, 2006).

TABELA 1 - FATORES DE COAGULAÇÃO

Fator	Nome	Origem
I	Fibrinogênio	Fígado
II	Protrombina	Fígado
III	Fator tecidual	Tecidos em geral
IV	Íons cálcio	Tecidos em geral
V	Pró-acelerina	Fígado
VII	Pró-convertina	Fígado
VIII	Fator anti-hemofílico	Endotélio
IX	Fator Christmas	Fígado
X	Fator de Stuart	Fígado
XI	Antecedente de tromboplastina	Fígado
XII	Fator de Hageman	Fígado
XIII	Fator estabilizador da fibrina	Fígado
Proteína C		Endotélio
Proteína S		Endotélio

FONTE: Adaptado de RAND; MURRAY (2007).

Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), independentemente, propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea. Nesse modelo existem dois mecanismos relacionados intimamente (intrínseco e extrínseco) que, quando estimulados, podem gerar fibrina a partir da ativação de fatores de coagulação capazes de ativar outros fatores de coagulação.

O mecanismo intrínseco refere-se à sequência de reações enzimáticas que se iniciam quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. Já o mecanismo extrínseco refere-se à sequência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resulta na liberação de extratos teciduais. Estas duas vias convergem para a ativação do fator X que, por meio de uma via comum de ativação da trombina (VOGLER; SIEDLECKI, 2009; CHEN; SEIFFERT; HAWES, 2014; KU; BAE, 2014).

2.2.1.1 Via Extrínseca

Conhecida também como via do fator tecidual, a via extrínseca é assim denominada pelo fato de que a substância ativadora da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com tecidos extravasculares, ou seja, o fator desencadeante que facilita a coagulação não se encontra circulante no sangue, sendo este fator a tromboplastina tecidual (fator III) ou fator tissular (*tissue factor* - TF) (MURRAY et al., 2007). O TF é uma glicoproteína transmembrana que normalmente não é expressa em células que entram em contato com o plasma, mas quando existe injúria vascular as células que expressam o TF são expostas ao plasma. Diferente de outros fatores envolvidos na coagulação sanguínea, o TF está sempre presente como um fator ativo (MARTINICHEN, 2005).

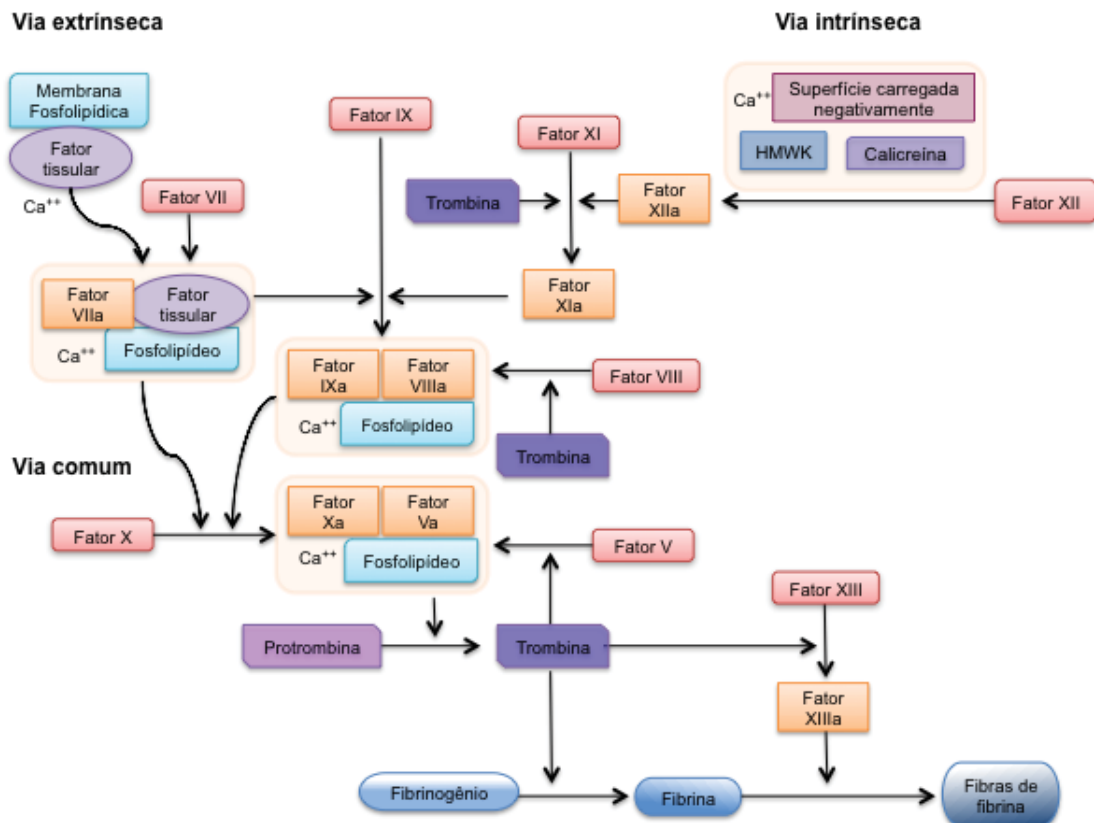
Após uma lesão vascular, o TF é exposto ao plasma e forma um complexo com o fator VIIa (1% do fator VII circulante encontra-se ativo), que é dependente de vitamina K. O complexo FT/VIIa converte os fatores IX e X nas suas formas ativas, reação que requer a participação de íons cálcio, conforme mostrado na Figura 3 (FRANCO, 2001; SMITH et al., 2005; MARTINICHEN, 2005; CARLOS; FREITAS, 2007).

2.2.1.2 Via Intrínseca

Essa via é também denominada de via de contato. Ela se inicia quando o sangue entra em contato com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas (CARLOS; FREITAS, 2007).

A exposição do sangue ao colágeno da parede vascular causa ativação de plaquetas, as quais mudam de forma, expondo fosfolipídios carregados negativamente e uma lipoproteína denominada fator plaquetário 3 (FP3) em sua superfície. Numa reação dependente de cininogênio de alto peso molecular (*high molecular weight kininogen* – HMWK) e caliceína ocorre, na superfície das plaquetas ativadas, a ativação do fator XII. Numa reação também dependente de HMWK, o fator XIIa ativa o fator XI. O fator XIa provoca a ativação do fator IX que em conjunto com o fator VIIIa e FP3 ativam o fator X, conforme mostrado na Figura 3 (FRANCO, 2001; CARLOS; SMITH et al., 2005; FREITAS, 2007).

FIGURA 2 - MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO



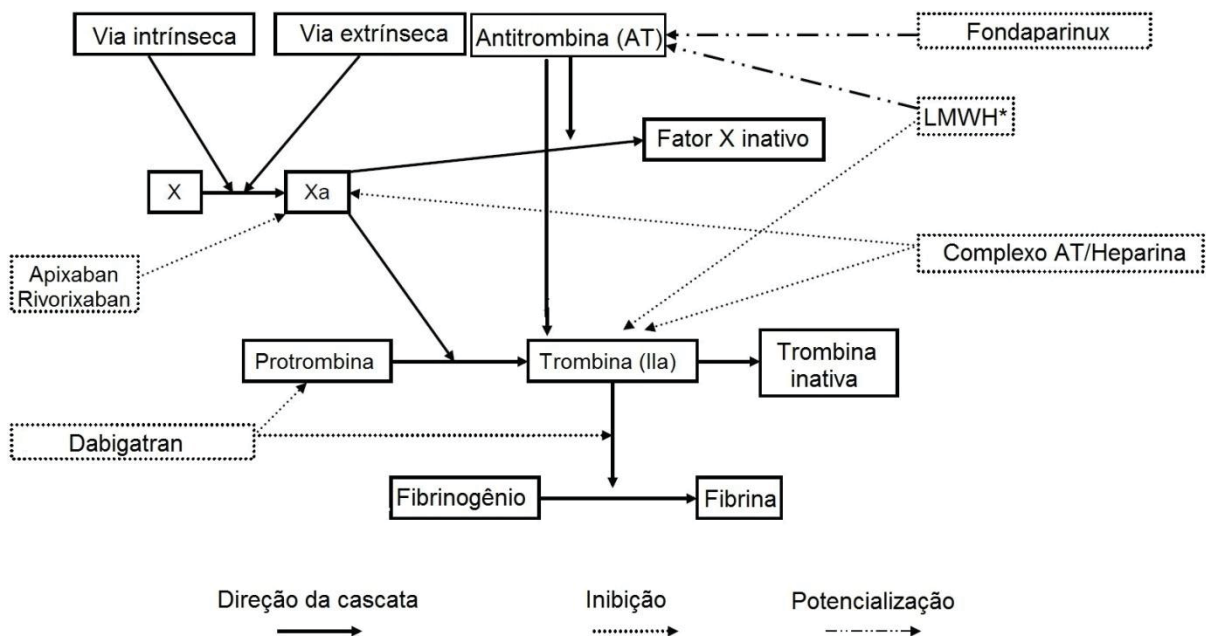
FONTE: Adaptado de *Common Pathway of Coagulation*. Acesso em: 2019.
 LEGENDA: HMWK (high molecular weight kininogen) cininogênio de alto peso molecular

2.2.1.3 Via Comum

Essa via se inicia com a ativação do fator X pela via intrínseca ou pela via extrínseca. O fator X ativado (FXa) combina-se com o fator V, fosfolípidios teciduais ou com fosfolípidios liberados pelas plaquetas para formar o complexo denominado ativador de protrombina, capaz de converter o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina), que tem como principal ação a conversão de fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina. Estes últimos são interligados covalentemente por meio de uma reação catalizada pelo fator XIIIa (fator estabilizador da fibrina; uma transglutaminase), formando polímeros insolúveis de fibrina (Figura 2) (CARLOS; FREITAS 2007; VOGLER; SIEDLECKI, 2009). O fator XIII é ativado pela trombina.

A trombina desencadeia a ativação plaquetária, estimula a produção dos fatores V, VIII e IX, medeia a clivagem proteolítica do fibrinogênio em fibrina e, conseqüentemente, a coagulação. Dado o papel central da trombina no desenvolvimento de um trombo, muitas estratégias para prevenir e tratar eventos tromboembólicos têm se concentrado na inibição da geração de trombina ou no bloqueio de sua atividade (Figura 3) (KU et al., 2014).

FIGURA 3 - ANTICOAGULANTES X CASCATA DE COAGULAÇÃO



FONTE: Adaptado de HARTER et al. (2015).

LEGENDA: * LMWH (low molecular weight heparin): Incluindo enoxiparina, dalteparina e tinazaparina.

2.2.2 Modelo de Hemostasia Baseado na Célula

A descrição do modelo clássico de coagulação pelas vias intrínseca e extrínseca tem sido largamente utilizada, no entanto, ela é entendida como inadequada do ponto de vista fisiológico da coagulação (FRANCO, 2001). Isso porque esse modelo didático não é capaz de explicar o motivo pelo qual a ativação do fator X extrinsecamente não compensa a falta do fator VIII ou IX. Para responder a isso, Hoffman e Monroe (2001) propuseram um modelo de hemostasia baseado na célula. Neste modelo a hemostasia é descrita como sobreposição de três fases: iniciação, amplificação e propagação, conforme Figura 4.

2.2.2.1 Fase de Iniciação

A fase de iniciação começa quando acontece uma lesão vascular, expondo colágeno e células que expressam fator tissular (TF). O fator VII circulante se liga rapidamente a esse TF exposto pelo dano no endotélio vascular, formando um complexo capaz de ativar o fator IX e X. O fator Xa liga-se ao fator V formando um complexo capaz de catalisar a formação da trombina a partir da protrombina (Figura 4) (VINE, 2009; EYRE; GAMLIN, 2010; HOFFMAN; MONROE 2001; NOGUEIRA, 2013).

2.2.2.2 Fase de Amplificação

Nessa fase, a trombina formada na fase inicial, juntamente com a pequena quantidade de plaquetas ativadas, é capaz de amplificar o processo de adesão plaquetária e ativar os fatores V, XI e VIII (CATERINA et al., 2013). O complexo não covalente formado pelo fator de vWF e fator VIII é clivado pela trombina liberando o vWF e gerando fator VIIIa. As plaquetas ativadas agora têm fatores Va, VIIIa, e XIa ligados às suas superfícies, como mostrado na Figura 4 (HOFFMAN; MONROE, 2001; MARTINICHEN, 2005; VINE, 2009; GRACHER, 2010; NOGUEIRA, 2013).

Dentre os diversos componentes do mecanismo anticoagulante, estão a antitrombina III, o cofator II de heparina (HCII) e os fatores fibrinolíticos (FRANCO, 2001).

2.3.1 Antitrombina

A antitrombina (AT), antes chamada de antitrombina III, é uma proteína pertencente à família das serpinas (inibidoras de serino proteases), com 58 kDa de massa molecular, produzida no fígado. Ela circula no plasma numa concentração de 150 µg/mL e inibe primariamente a trombina, além de exercer efeito inibitório sobre os fatores IXa, Xa e o XIa e acelerar a dissociação do complexo VIIa/TF, impedindo sua reassociação (FRANCO, 2001; NOGUEIRA 2013; VINE, 2009).

A atividade inibitória da AT é lenta, no entanto quando na presença de heparan sulfato ou heparina, sua ação é potentemente acelerada. Isso porque essa combinação causa uma modificação conformacional na AT promovendo a ligação mais específica à trombina ou às outras moléculas (FRANCO, 2001; HINSBERGH, 2001).

2.3.2 Cofator II da Heparina

O cofator II da heparina (HCII) tem aproximadamente 66 kDa e também pertence à família das serpinas, mas diferente da AT, o HCII tem ação inibitória lenta e exclusiva sobre a trombina, mas pode se tornar mais efetivo na presença de heparina. Essa ligação acontece apenas em altas concentrações a heparina, quando presente no plasma em concentrações terapêuticas, a heparina liga-se preferencialmente à antitrombina (TOLLEFSEN, 2007; UMASUTHAN et al., 2011).

2.3.3 Fibrinólise

A formação dos coágulos em processos hemostáticos é de extrema importância, assim como sua dissolução para manter o equilíbrio dinâmico na coagulação. A dissolução do coágulo de fibrina depende da sua retração e degradação da fibrina insolúvel, processo esse denominado de fibrinólise (CARLOS; FREITAS, 2007).

A lise do coágulo de fibrina ocorre por meio da ação da plasmina, uma serinoprotease produzida no fígado, que circula no plasma na sua forma inativa, denominada plasminogênio. A ativação da plasmina se dá pela ação do ativador de plasminogênio tecidual (*tissue type plasminogen activator* - tPA) e do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (*urokinase type plasminogen activator* - uPA) (FRANCO, 2001; SMITH et al., 2005; CARLOS; FREITAS, 2007; BERNA-ERRO et al., 2013).

A fibrinólise é interrompida pela inibição da plasmina ou do tPA, pela α 2-antiplasmina ou α 2-macroglobulina e pelo inibidor do ativador do plasminogênio – 1 (*plasminogen activator inhibitor* – 1 – PAI – 1) (SMITH et al., 2005; GRACHER, 2010).

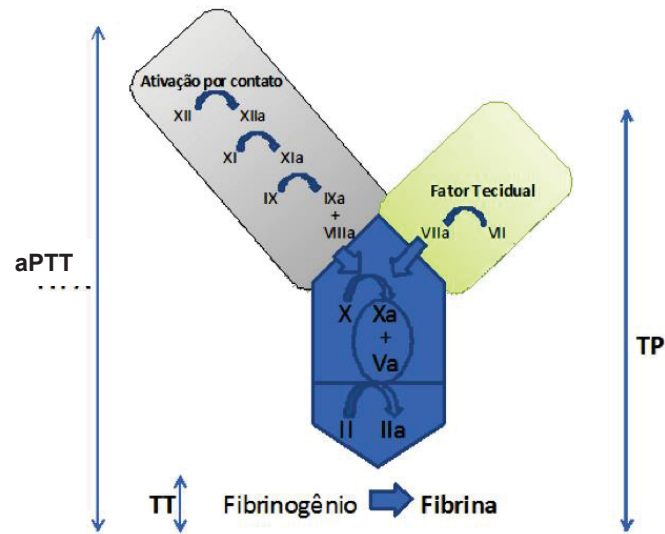
2.4 COAGULAÇÃO *IN VITRO*

O sangue coagula de 4 a 8 minutos quando colocado em tubo de ensaio. A coagulação é evitada com a adição de um agente quelante como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou citrato de sódio, que complexam com o cálcio do sangue, diminuindo a concentração plasmática de cálcio ionizado. O plasma recalcificado coagula de 2 a 4 minutos. Após a recalcificação o tempo de coagulação é reduzido para 26 a 33 segundos pela adição de fosfolipídios de carga negativa e de uma substância particulada como o caolim (silicato de alumínio). Esse processo pode ser verificado num teste denominado de tempo de tromboplastina parcial ativada (*activated partial thromboplastin time* - aPTT) (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; GUYTON; HALL, 2006).

Diferentes ensaios *in vitro* envolvendo o modelo de cascata de coagulação, podem ser utilizados em laboratório para acompanhamento do tempo de coagulação sanguínea da via intrínseca, extrínseca e comum.

O ensaio de aPTT é o teste comumente utilizado para verificar o mecanismo intrínseco de coagulação, o TP (*prothrombin time* – tempo de protrombina) para verificar o mecanismo extrínseco e o TT (*thrombin time* – tempo de trombina) para avaliação da via comum (Figura 5) (CURRY; PIERCE, 2007).

FIGURA 5 - VISÃO GERAL DOS TESTES DE COAGULAÇÃO



FONTE: Adaptado de Clé et al. (2010).

2.5 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS

Algumas características fisiopatológicas tornam a trombose arterial diferente da trombose venosa, resultando em tratamentos distintos. O tratamento da trombose utiliza agentes com atividades antiplaquetária, anticoagulante e antitrombótica (SORIGUE et al., 2018).

Basicamente a trombose arterial é tratada com fármacos antiplaquetários, já que a morfologia de um trombo dessa natureza tende a apresentar uma quantidade abundante de plaquetas (WOLBERG et al., 2015). Exemplos de antiplaquetários são o ácido acetil salicílico e o Clopidogrel (MADEIRA et al., 2018). Por outro lado, a trombose venosa é tratada com fármacos antitrombóticos ou anticoagulantes, pois o trombo venoso apresenta alto conteúdo de glóbulos vermelhos e fibrina (JAY; LIU, 2006; WOLBERG et al., 2015).

Os fármacos anticoagulantes previnem a formação ou extensão do trombo, reduzindo a atividade de várias proteases da cascata de coagulação (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; MACKMAN, 2008). Os fármacos antitrombóticos são utilizados na dissolução de trombos já estabelecidos, através da indução da conversão de plasminogênio inativo na enzima ativa plasmina, que degrada a matriz de fibrina responsável pela estabilização de trombos (HARTER et al., 2015).

A tabela abaixo apresenta alguns agentes anticoagulantes e antitrombóticos utilizados atualmente. Além disso, ela ainda mostra alguns efeitos adversos que

esses fármacos podem causar e que tipo de agente pode reverter o efeito causado por eles (antídoto).

TABELA 2 - AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS.

			Continua
	Monitoramento laboratorial	Efeitos adversos	Antídoto
Antagonista da Vitamina K			
Varfarina	PT	Hemorragia, urticária, necrose cutânea	Vitamina K, PCC
Heparinas			
Heparina não-fracionada (UFH)	aPTT	Hemorragia, trombocitopenia	Protamina Sulfato
Enoxaparina *	Anti Fator Xa	Hemorragia, trombocitopenia	Protamina Sulfato
Dalteparina *	Anti Fator Xa	Hemorragia, trombocitopenia	Protamina Sulfato
Tinzaparina *	Anti Fator Xa	Hemorragia, trombocitopenia	Protamina Sulfato
Inibidor do Fator Xa			
Fondaparinux	Anti Fator Xa	Hemorragia	PCC
Rivaroxibana	Anti Fator Xa	Hemorragia	PCC
Apixabana	Anti Fator Xa	Hemorragia	PCC
Inibidor direto da Trombina			
Dadigatrana	PT	Hemorragia	PCC
Bivalirudina	PT	Hemorragia	PCC
Argatrobana	PT	Hemorragia	PCC

			Conclusão
	Monitoramento laboratorial	Efeitos adversos	Antídoto
Fibrinolíticos			
Alteplase	aPTT, PT, Fibrinogênio	Hemorragia	Ácido aminocaproico, Ácido tranexâmico
Reteplase	aPTT, PT, Fibrinogênio	Hemorragia	Ácido aminocaproico, Ácido tranexâmico
Tenecteplase	aPTT, PT, Fibrinogênio	Hemorragia	Ácido aminocaproico, Ácido tranexâmico
Uroquinase	aPTT, PT, Fibrinogênio	Hemorragia	Ácido aminocaproico, Ácido tranexâmico

FONTE: Adaptado de HARTER et al. (2015).

LEGENDA: aPTT: *activated partial thromboplastin time* (tempo de tromboplastina parcial ativada); PT: *pro-thrombin time* (tempo de protrombina), UFH: *unfractionated heparin* (heparina não-fractionada); PCC: *prothrombin complex concentrates* (concentrado de complexo de protombina).

NOTA:* Heparina de baixo peso molecular (LMWH – *Low molecular weight heparin*).

2.5.1 Anticoagulantes Naturais

A trombose pode ser evitada através de vários mecanismos reguladores que exigem um endotélio vascular no estado normal, como por exemplo pela prostaciclina, que é um metabólito do ácido araquidônico sintetizado pelas células endoteliais capaz de inibir a agregação plaquetária quando necessário. A antitrombina, como comentado anteriormente, também tem a capacidade de interferir na trombose atuando sobre os fatores da cascata de coagulação. Os proteoglicanos de sulfato de heparan ou heparan sulfato, sintetizados pelas células endoteliais, são capazes de estimular a atividade da antitrombina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Além desses a proteína C ativada combinada com a proteína S, também é capaz de diminuir acentuadamente as taxas de ativação da protrombina e do fator Xa, por meio da degradação dos fatores Va e VIIIa (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; NOGUEIRA, 2013).

2.5.2 Anticoagulantes Orais

Anticoagulantes orais são antagonistas da vitamina K e a principal toxicidade apresentada por eles é o sangramento. Clinicamente eles são utilizados para impedir a progressão ou a recidiva da TVP ou da EP (HIRSH et al., 2003).

Os fatores de coagulação II, VII, IX, X e as proteínas C e S são sintetizados, em grande parte, no fígado. Ainda no interior celular, ocorre uma mudança pós-traducional, que consiste na γ -carboxilação de resíduos de glutamato destas proteínas. Esta reação é catalisada por uma enzima carboxilase dependente de vitamina K. A varfarina é um composto cumarínico que atua bloqueando a regeneração da vitamina K, reduzindo de 30 a 50% a ativação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K produzidos pelo fígado (TOLLEFSEN, 2006; GRACHER, 2010; MAJERUS).

A varfarina é o anticoagulante oral mais popular, no entanto existem outros fármacos comercializados, como por exemplo, a femprocumona e acenocumarol, agentes não disponíveis nos EUA, mas prescritos em outros países, inclusive na Europa. Outros fármacos anticoagulantes orais incluem os derivados de indandiona (anisindiona e fenindiona), proibido em alguns países por acarretar hipersensibilidade grave no início da terapia. Rodenticidas como a bromodiolona, brodifacum, difenadiona, clorofacinona e pindona são agentes de longa duração que podem exigir altas doses de vitamina K durante semanas ou meses para reverter o quadro. Por fim, a ximelogatrana é um fármaco novo, com efeito colateral assintomático, mas ainda não aprovado para comercialização nos EUA (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2007).

2.5.3 Anticoagulantes Parenterais

Entre os agentes anticoagulantes parenterais, encontra-se os inibidores direto da trombina como a bivalirudina e a lepidurina, derivados da hirudina presente nas glândulas salivares das sanguessugas. A partir da hirudina outras substâncias foram desenvolvidas, entre elas, Hirulog, Hirugen e Argotroban (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; JAY; LIU, 2006).

Também se encontram nesse grupo a argatrobana, que pode substituir a lepidurina, o danoparanóide, que promovem inibição do fator Xa, a adrotecogina,

que inibe os fatores Va e Villa, e o principal deles, a heparina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

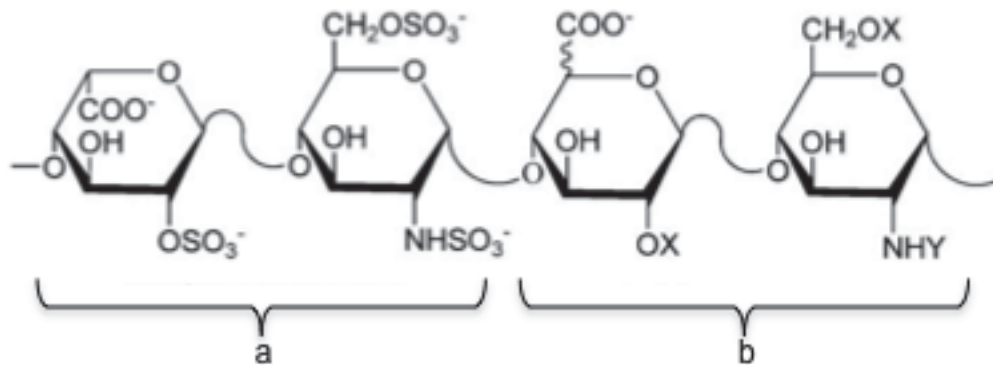
2.5.3.1 Heparina

A heparina foi descoberta em 1916 por Jay McLean, um estudante do segundo ano de medicina, em colaboração com o Professor William Henry Howell, que foi o primeiro a utilizar o termo heparina, do Grego “Hepar” ou fígado, local de onde ela foi isolada. Como solução anticoagulante, a heparina foi testada pela primeira vez, em humanos, em 16 de abril de 1937, por Murray e Best (WARDROP; KEELING, 2008; LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009). Porém não se sabia exatamente a que era atribuído o efeito anticoagulante. Somente mais tarde estudos demonstraram que essa atividade era dependente de um componente plasmático. Em 1968, Abildgaard confirmou estes dados após isolar, pela primeira vez, a antitrombina (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003; VISKOV et al., 2013).

Sintetizada pelos grânulos secretores dos mastócitos, e obtida a partir do pulmão bovino ou da mucosa intestinal do porco, a heparina é um glicosaminoglicano altamente sulfatado, com massa molecular que pode variar de 3 e 30 kDa. Ela é composta majoritariamente pela repetição de uma unidade dissacarídica constituída por um ácido urônico, que pode ser ácido α -L-idurônico (IdoA) ou β -D-glucurônico (GlcA), e um aminoaçúcar, a α -D-glucosamina (GlcN) (FIGURA 6) (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009; ZHANG et al., 2011).

A heparina é uma molécula bastante heterogênea. Exemplo disso é a possibilidade de presença ou de ausência de O-sulfato no carbono 2 (C-2) dos resíduos de ácido urônico, e no C-3 ou C-6 da glucosamina. Além do nitrogênio desse açúcar aminado poder apresentar-se na sua forma sulfatada (GlcNSO₃), acetilada (GlcNAc) ou, menos frequentemente, permanecer sem substituição (CAPILA; LINHARDT, 2002; NOTI; SEEBERGER, 2005).

FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS UNIDADES MAJORITÁRIAS E MINORITÁRIAS DA HEPARINA.



FONTE: Adaptado de Liu, Zhang e Linhardt (2009)

LEGENDA: **a.** Sequência majoritária de 2-O-sulfo- α -L-ácido idurônico-(1 \rightarrow 4)-6-O-sulfo-N-sulfo- α D-glucosamina. **b.** Sequência minoritária, onde X = SO₃

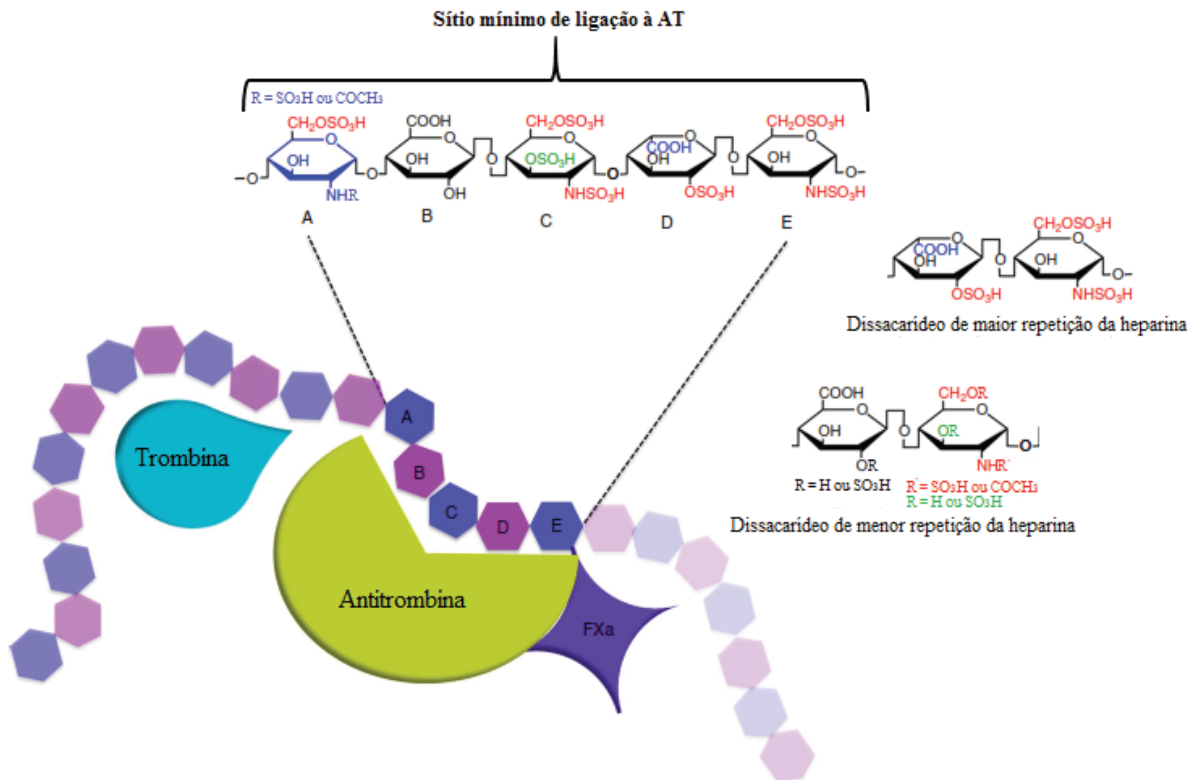
2.5.3.2 Mecanismo de Ação da Heparina

A heparina catalisa a inibição de várias proteases da coagulação de forma indireta, ou seja, ela atua potencializando a ação inibitória exercida pelas serpinas, como a antitrombina (AT) e cofactor II de heparina (HCII).

Essa ação catalítica da heparina é principalmente atribuída à habilidade de ligação a sítios básicos através de seus grupos sulfatos e carboxílicos carregados negativamente (CIPRIANI et al., 2009).

Quando ligada, a heparina causa alteração na conformação da AT, fazendo com que seu local reativo se torne mais acessível, favorecendo a ligação da trombina ou do fator Xa. A heparina, serpina e serino protease ligadas, formam um complexo ternário (Figura 7) capaz de aumentar a velocidade da reação de inibição da trombina pela AT em até 1.000 vezes. Logo em seguida a heparina é liberada (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

FIGURA 7 - COMPLEXO TERNÁRIO HEPARINA/ANTITROMBINA/SERINO PROTEASE



FONTE: Adaptado de RABESTEIN (2002) e CHANDARAJOTI et al. (2016).

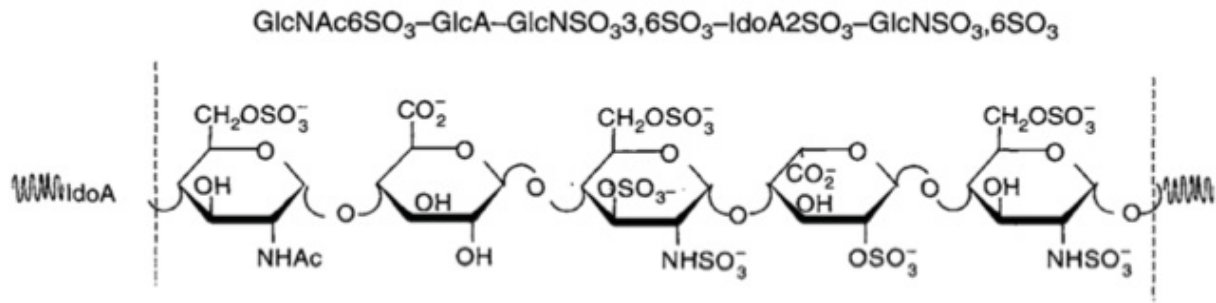
LEGENDA: Monômero A, B, C, D, E: GlcNAc6SO₃-GlcA-GlcNSO₃3,6SO₃-IdoA2SO₃GlcNSO₃6SO₃.

Sequência dissacarídica de maior repetição: IdoA2SO₃-GlcN6SO₃.

Sequência dissacarídica de menor repetição: GlcA2R-GlcN2,6R.

Apenas as heparinas com cadeias maiores que dezoito resíduos monossacarídicos, conhecidas como não-fracionadas (unfractionated heparins - UFH), conseguem fazer a ligação da AT com a trombina, isso porque elas apresentam uma sequência pentassacarídica específica, descrita em 1979 por Lindahl et al., que contém um resíduo de glucosamina 3-O-sulfatada (Figura 8) (CLÉ et al., 2010). As cadeias de heparina que não apresentam o resíduo de glucosamina 3-O-sulfatada normalmente tem menor afinidade com a antitrombina e acabam sendo responsáveis pela ligação ao cofator II da heparina (VISKOV et al., 2013).

FIGURA 8 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA À ANTITROMBINA



FONTE: Adaptado de Casu (2005).

2.5.3.3 Limitações do Uso da Heparina

Atualmente a heparina é o principal agente anticoagulante e antitrombótico utilizado na prevenção e no tratamento de distúrbios tromboembólicos. Em relação à utilização só perde para a insulina no que diz respeito a agente terapêutico natural (HIRSH et al., 2001), sendo que seu consumo anual já ultrapassou 100 toneladas (VISKOV et al., 2013).

Apesar de seu efeito comprovado e sua popularidade, o uso da heparina como fármaco tem limitações e gera preocupação devido aos seus efeitos adversos, que podem implicar em sangramento, osteoporose, erupções na pele, dermatite de contato, urticarial, trombocitopenia induzida, falha hepática entre outros (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; MAAS et al., 2012). Além disso, há a possibilidade de contaminação por prion e vírus já que ela é proveniente de fontes animais como a mucosa intestinal de porco ou pulmão bovino. Outro fator agravante é a diferença entre os lotes produzidos, uma vez que as moléculas de heparina são bastante heterogêneas estruturalmente (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009).

Desde os anos 90, após serem observados casos de encefalopatia espongiiforme bovina, ou doença da vaca louca ou doença do *prion*, somente a heparina derivada de porco pode ser utilizada nos EUA e Europa (GRACHER, 2010; NOGUEIRA, 2013).

2.5.3.4 Heparina de Baixa Massa Molecular

Na tentativa de melhorar o comportamento farmacológico da heparina e minimizar seus efeitos adversos, foram desenvolvidas as heparinas de baixa massa

molecular (low molecular weight heparins – LMWH) a partir da clivagem enzimática ou química da heparina não-fracionada (UFH) (NOGUEIRA, 2013). Exemplos desse tipo de fármaco é a enoxaparina, dalteparina, tinzaparina, ardeparina, nadroparina e a reviparina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Assim como a UFH, a LMWH também apresenta a sequência pentassacarídica específica de ligação à AT, no entanto suas cadeias são menores (2 a 10 kDa) e por isso não tem extensão suficiente para formar o complexo ternário de UFH, AT e trombina. As alterações exercidas na AT pela LMWH são suficientes para catalisar apenas a inibição do fator Xa, como é o caso do pentassacarídeo sintético, fondaparinux (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; CLÉ et al., 2010).

Mesmo apresentando menos efeitos adversos que as UFHs, as LMWHs ainda possuem algumas limitações. Também são polímeros heterogêneos, de massa molecular indefinida e cadeia polissacarídica variável (CAUGHEY, 2003). Além do fato delas não responderem bem ao sulfato de protamina, antagonista da heparina, utilizado no caso de uma superdosagem (GRACHER, 2010).

2.6 PROTAMINA

Um sangramento leve causado pelo tratamento com heparina pode ser controlado sem a administração de antagonista. Já numa hemorragia grave, o efeito anticoagulante da heparina é revertido com a infusão lenta de sulfato de protamina. A neutralização ocorre após 5 minutos da infusão.

A protamina é uma proteína extraída do esperma de diversas espécies de salmão, possui baixo peso molecular (5 kDa) e elevada proporção de arginina, um aminoácido básico, carregado positivamente em condições fisiológicas (AINLE et al., 2009).

Clinicamente, a protamina é utilizada para reverter o efeito anticoagulante da heparina após cirurgia cardíaca e outros procedimentos vasculares. Ela deve ser administrada por via intravenosa (até 5 mg durante 10 minutos) em quantidade mínima suficiente para neutralizar a heparina existente no organismo (1 mg de protamina neutraliza 1000 U de heparina existente no paciente) (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

2.7 HEPARINA COMO ANTICOAGULANTE PARA COLETA DE SANGUE

Segundo o Manual de coleta de amostras e exames em patologia clínica e anatomopatologia do CDMA (Centro de Diagnóstico e Monitoramento Animal), sangue total e plasma sanguíneo são algumas das amostras biológicas destinadas ao laboratório clínico. Para a obtenção desses é necessário a utilização de um agente anticoagulante.

Análises de sangue total são indicadas para hemograma completo (contagem global de hemácias, leucócitos, plaquetas, determinação do hematócrito, VCM - volume corpuscular médio, HCM - hemoglobina corpuscular média, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média e dosagem de hemoglobina).

O plasma sanguíneo é o sobrenadante do sangue total após centrifugação das células do sangue. Ele é principalmente indicado para análises dos tempos de coagulação e determinação de fatores da coagulação, mas também pode ser utilizado para a determinação de diversos parâmetros bioquímicos, tais como perfil glicêmico e lipídico.

Os anticoagulantes normalmente utilizados são o EDTA, citrato de sódio e heparina:

a) EDTA (ácido etileno diaminotetracético) – tubo de tampa roxa: Este anticoagulante age neutralizando, por quelação os sais de cálcio, que são fundamentais para os processos de formação do coágulo. É o anticoagulante de escolha em hematologia, pois, se usado corretamente, é o que melhor preserva as células e suas características morfológicas. Utiliza-se 1mg para 1 mL de sangue ou 0,1 mL de solução a 1% para cada 1 mL de sangue.

b) Citrato de sódio – tubo de tampa azul: O citrato de sódio age quelando cálcio impedindo o processo de coagulação. É empregado na conservação do sangue para as análises de fibrinogênio, tempo de protrombina ou a coagulometria completa. Para conservação do sangue utiliza-se 1 parte deste anticoagulante para 9 de sangue total (1:9) sendo de específica importância para análise correta.

c) Heparina – tubo de tampa verde: A heparina é o anticoagulante que menos interfere com os reagentes usados na maioria dos testes. Os tubos de tampa verde são revestidos com spray seco de heparina de lítio, sódio ou amônio. Esses aditivos são anticoagulantes que ativam as enzimas antiplaquetárias, bloqueando a cascata de coagulação dos elementos do sangue. Pode ser usada para coletas

hematológica, embora possa interferir um pouco com a coloração das células, em especial os leucócitos. Ela é melhor empregada quando se pretende fazer análises hematológicas e bioquímicas em uma mesma amostra. Utilizam-se 0,2 mL de solução saturada de heparina por mL de sangue. Após 24 horas ocorre degeneração nuclear dos neutrófilos, degeneração citoplasmática dos neutrófilos e monócitos.

2.8 POLISSACARÍDEOS NATURALMENTE OU QUIMICAMENTE SULFATADOS ALTERNATIVOS À HEPARINA

As dificuldades associadas às terapias com heparina abriram espaço para estudos voltados para investigação de novos agentes anticoagulantes e antitrombóticos (PERRINAUD et al., 2006; MACKMAN, 2008). Muitos destes estudos são focados em polissacarídeos sulfatados, como a heparina, os quais podem ser quimicamente ou naturalmente sulfatados (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005; CIPRIANI et al., 2009; MAAS et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; BARDDAL et al., 2015; ROMAN et al., 2017).

Polissacarídeos naturalmente sulfatados são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados como componentes de matriz extracelular, na superfície de células de vertebrados ou são sintetizados por organismos marinho (ALBAN et al., 2002). Contudo, alguns polissacarídeos de interesse não possuem grupamentos sulfato naturalmente, exigindo a inserção desses grupos a partir de reações químicas. A sulfatação química de polissacarídeos é um dos processos mais utilizados para obtenção de análogos da heparina (ARAÚJO et al., 2013). Diversos reagentes podem ser utilizados na reação de sulfatação química quando se trata de polissacarídeos, como por exemplo: complexos de trióxido de enxofre (SO_3) e piridina (WU et al., 1998; MESTECKHINA et al., 2006), ácido piridina-N-sulfônico e DMSO (YOSHIDA et al., 1993; MIHAI; MOCANU; CARPOV, 2001), sulfato de metil-sódio e metil-piridínio (TAKANO et al., 2000) e o ácido clorossulfônico e piridina (O'NEILL, 1955). Os solventes mais usados nesses processos são a piridina, formamida, dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) (O'NEILL, 1955).

A proporção molar do agente sulfatante em relação às hidroxilas livres do polissacarídeo a ser sulfatado, a temperatura e o tempo de reação, são considerados os fatores fundamentais para regular o número de grupos sulfato

introduzidos por unidade monomérica (MESTECKHINA; SHCHERBUKHIN, 2010; JINDAL et al., 2013).

As atividades biológicas atribuídas aos polissacarídeos quimicamente ou naturalmente sulfatados, está intimamente relacionada com a estrutura química do polissacarídeo. A estrutura pode variar conforme a fonte e forma de obtenção do polissacarídeo, condições de sulfatação química, agente sulfatante, quantidade e posição de inserção de grupamentos sulfato, além do tamanho da molécula nativa ou produzida após uma modificação química (ALBAN; FRANZ, 2001; FONSECA et al., 2008; POMIN, 2009; ARAÚJO et al., 2013). Por exemplo, CIPRIANI et al. (2009) sulfataram quimicamente unidades de ácidos urônicos de uma pectina cítrica com M_w de 12 kDa, a qual apresentou melhor efeito antitrombótico comparado com a pectina cítrica de M_w de 3,6 kDa.

Barddal et al. (2015) estudaram uma glucuronomanana proveniente da *Vochysia thyrsoidea*, de baixa massa molecular e quimicamente sulfatada. Os autores verificaram atividade anticoagulante e antitrombótica, a qual foi atribuída à inserção de grupos sulfato na posição O-6 das unidades de manose e ao baixo M_w da molécula. Já Roman et al. (2017) encontraram diferentes atividades anticoagulantes ao sulfatar quimicamente, em condições distintas, uma fucogalactana proveniente do fungo *Agaricus bisporus*.

A galactoglucomanana obtida do líquen *Cladonia ibitipocae*, sulfatada quimicamente por Martinichen-Herrero et al. (2005), apresentou 42,2% de grupos sulfato que foram preferencialmente inseridos em O-6 das galactoses e manoses, o que contribuiu para uma resposta anticoagulante e antitrombótica efetiva.

Araújo et al. (2013) sulfataram regioseletivamente uma carragenana de *Kappaphycus alvarezii*, e verificaram uma melhor atividade anticoagulante quando a posição de entrada do grupo sulfato ocorria em O-2 e O-6 das unidades de galactoses. Além da posição de entrada, a quantidade de grupos sulfato inseridos também foi importante para a atividade.

Mourão e Pereira (1999) realizaram estudos com polissacarídeos naturalmente sulfatados de algas pardas e equinodermos e verificaram atividade anticoagulante e antitrombótica para ambos. No entanto, após um processo de dessulfatação a propriedade anticoagulante *in vitro* deixou de existir, mostrando a importância e a necessidade de grupos sulfato para o efeito sobre a coagulação. Eles também apresentaram avaliações relacionadas com o mecanismo de ação

sobre a inibição da α -trombina e puderam verificar que, na presença de antitrombina ou cofator II de heparina, o polissacarídeo sulfatado era eficiente, mas trocando um monossacarídeo, a posição de entrada do grupo sulfato ou até mesmo a posição da ligação glicosídica, esse efeito não era considerável.

Nagumo e Nishino (1996) estudaram fucanas naturalmente sulfatadas também de alga parda, e obtiveram dois grupos distintos delas. O primeiro grupo de fucanas apresentou altas porcentagens de ácido glucurônico, mas baixo grau de sulfatação. A maioria dos grupos sulfatos ocupava a posição C-3 das unidades de fucose (1 \rightarrow 4) ligadas. Este grupo apresentou atividade anticoagulante muito baixa, assim como para outras fucanas sulfatadas com características químicas similares. O segundo grupo de fucanas apresentava baixa porcentagem de ácido glucurônico, mas alto grau de sulfatação nas unidades de fucose. No entanto, foi verificado o mesmo resultado que no grupo anterior, ou seja, baixa atividade anticoagulante, demonstrando que o teor de grupos sulfatos é apenas um dos fatores requeridos para esta atividade. Esta observação também foi feita nos estudos de Chevolut et al. (1999) e Mulloy, Mourão e Gray (2000), onde considerações sobre a posição do grupo sulfato e sua relevância para a atividade anticoagulante foram ditas como importantes, visto que as funções biológicas dependem da ligação específica da estrutura do carboidrato com seu alvo.

Polissacarídeos extraídos de goma de bael e do caqui e, quando submetidos ao processo de sulfatação química por Jindal et al. (2013), Lu et al. (2012), respectivamente, demonstraram potencial biológico, incluindo atividade anticoagulante e antitrombótica. Jindal et al., observaram que a razão entre o polissacarídeo, a piridina usada no processo de sulfatação e a temperatura de reação têm um papel importante na quantidade final de grupos sulfato inseridos na molécula. Já Lu et al., verificaram que além de depender das condições de sulfatação, a atividade anticoagulante observada em seu trabalho, também foi dependente do grau de sulfatação e do peso molecular do polissacarídeo.

Maas et al. (2012) estudando a pectina cítrica quimicamente sulfatada, verificaram baixo risco de sangramento e um mecanismo de ação anticoagulante similar ao da heparina, ou seja, dependente de serpina. Além de constatar que na ausência dos grupos sulfato, os polissacarídeos não afetavam o teste de aPTT.

Em 2014, Yufeng et al., estudaram um polissacarídeo de *Umbilicaria esculenta*, líquen utilizado na culinária chinesa. Eles verificaram que, in vivo e in

vitro, esse polissacarídeo era um agente promissor no tratamento de doenças trombóticas.

Jiang et al. (2015) e Liu et al. (2009) sulfataram quimicamente os polissacarídeos provenientes de bivalves e fungos, respectivamente, a fim de verificar alguma atividade biológica. A inserção do grupo sulfato na posição C-6 da glucose por Jiang resultou numa melhor atividade antitumoral in vitro em comparação com a mesma amostra não sulfatada. Já a sulfatação em C-2, realizada por Liu, na qual não foi observado degradação do polissacarídeo durante o processo de modificação química, tornou o polissacarídeo potencialmente antiangiogênico.

Trabalhando com glucanas de fungos, Vasconcelos (2009), verificou que o processo de sulfatação química aumentava a solubilidade do polissacarídeo além de induzir uma atividade anticoagulante acentuada em relação à molécula não sulfatada.

2.9 GOMA GUAR

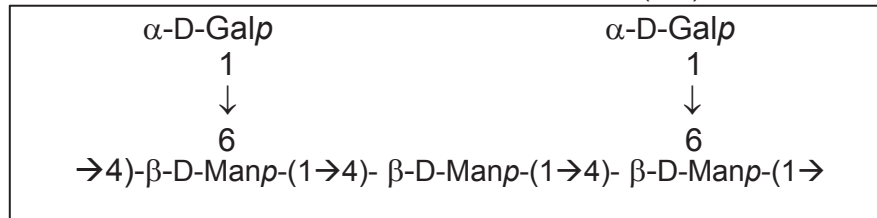
O termo "goma" é utilizado para descrever produtos de natureza polissacarídica de ocorrência natural. Várias partes da planta podem possuir goma, como paredes celulares, exsudatos de árvores, sementes, raízes e tubérculos (MIRHOSSEINI; AMID, 2012). O favorecimento da exsudação de uma goma vegetal acontece geralmente quando a planta passa por condições de estresse, como injúria física, ataque de micro-organismos, períodos de estiagem e outros fatores ambientais (SANDFORD; BAIRD, 1983).

As gomas são uma das mais abundantes matérias primas industriais e tem sido objeto de intensa investigação devido à sua sustentabilidade, biodegradabilidade e biossegurança. Muitas gomas se apresentam em forma de géis e sua força depende da sua estrutura, concentração, pH e temperatura (RANA et al., 2011).

A Goma guar é constituída por um polissacarídeo derivado das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, família Leguminosae, cultivada há séculos, principalmente na Índia e no Paquistão, para alimentação humana e animal (YOON et al., 2007). Com massa molecular elevada, variando entre 2.000 e 3.000 kDa (SUMIT et al., 2015), ela consiste em cadeias de β -manose (1 \rightarrow 4) ligadas, contendo substituições em O-6 por terminais não redutores de α -galactose (Figura 7), numa

razão média manose/galactose de 1,8:1, (PRAJAPATI et al., 2013; PRABAHARAN, 2011).

FIGURA 9 - ESTRUTURA DA GOMA GUAR (GG)



FONTE: O autor, 2019.

Comercialmente, a GG é disponível em várias granulometrias e velocidades de hidratação. Apesar de não formar gel, ela atua como agente espessante e emulsificante, sendo indicada para uso no preparo de sorvetes, cremes, produtos à base de queijo, molhos, sopas e produtos de panificação (SUMIT et al., 2015).

Na literatura são encontrados diversos estudos com GG, principalmente quanto às suas propriedades reológicas (PRAJAPATI et al., 2013), formação de nanofilmes (CHATURBHUIJ et al., 2015) e no âmbito alimentício (YOON et al., 2007; SUMIT et al., 2015). Contudo, devido à sua natureza não-tóxica, a GG é muito visada em estudos farmacológicos que contemplam modelos de veículos de distribuição de drogas orais (SHYALE et al., 2006; PRABAHARAN, 2011; SUBHRASEEMA; USHARANI, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Existe um grande interesse em encontrar novas moléculas com características anticoagulantes e antitrombóticas, de origem não animal, que sejam potencialmente seguras, e de fácil e ampla obtenção, para serem utilizadas como alternativas à heparina. Polissacarídeos de gomas comerciais têm um atrativo nesse âmbito, já que não são tóxicos, possuem mercado consolidado e são de fácil obtenção. Contudo, uma vez que grupamentos sulfato não ocorrem naturalmente em polissacarídeos de gomas, mas são essenciais para os efeitos gerados pela heparina, uma estratégia para a obtenção de novos agentes com atividade anticoagulante e antitrombótica é a sulfatação química desses polissacarídeos. Além dos grupos sulfato, a heparina é encontrada em forma de baixa e alta massa molecular, o que a torna eficiente quanto a diferentes vias de aplicação. Uma vez que polissacarídeos de gomas vegetais apresentam normalmente elevada massa molecular, a submissão à hidrólise ácida parcial se faz necessária para obtenção de moléculas de baixa massa, com potencialidade de utilização *in vivo*, por via subcutânea por exemplo. Além disso, ao mesmo tempo que novos compostos anticoagulantes são estudados para uma aplicação *in vivo*, como um medicamento, eles também têm potencial para serem avaliados como anticoagulantes para uso *in vitro*, para viabilizar a realização de análises clínicas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Esse projeto teve como objetivo geral obter um polissacarídeo, modificado quimicamente, com atividade anticoagulante e antitrombótica, a partir de goma comercial guar.

4.1.1 Objetivos específicos

- a) Obter frações de baixa massa molecular do polissacarídeo da goma guar a partir de hidrólise ácida parcial;
- b) Modificar estruturalmente os polissacarídeos nativo e parcialmente hidrolisado da goma comercial guar através de dois métodos de sulfatação química;
- c) Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos;
- d) Avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados;
- e) Avaliar o efeito anticoagulante *ex vivo* dos polissacarídeos sulfatado;
- f) Avaliar a atividade antitrombótica *in vivo* do polissacarídeo sulfatado com melhor atividade anticoagulante *in vitro*;
- g) Determinar o provável mecanismo anticoagulante e antitrombótico do polissacarídeo sulfatado com melhor atividade anticoagulante *in vitro*;
- h) Avaliar a possibilidade de uso do polissacarídeo sulfatado como anticoagulante laboratorial;
- i) Avaliar a possibilidade de uso contínuo, *in vivo*, do polissacarídeo sulfatado de baixa massa.

ARTIGO I

(Manuscrito enviado para International Journal of biological Macromolecules)

Anticoagulant and antithrombotic activity of native and partially degraded guar gum
after chemical sulfation

Helyn Priscila de Oliveira Barddal ^a, Franciê Assis Melo Faria ^a, Alexsandro Vinícius Nogueira ^a, Marcello Iacomini ^a, Thales Ricardo Cipriani ^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Sector of Biological Sciences, Federal University of Paraná, CP 19.046, CEP 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.

* Corresponding author. E-mail address: trcipriani@ufpr.br

ABSTRACT

Heparin plays an extremely important and recognized role in the setting of anticoagulant and antithrombotic therapy. This is due to the fact that it is able to bind mainly to the inhibitory enzymes of the coagulation cascade, increasing the action potential of these inhibitors. Although it is potent and widely used, the patient who uses it may need laboratory monitoring to prevent bleeding episodes. Due to the adverse effects of heparin and the fact that it comes from animal sources, extensive research has been done with plant-based products to develop safe anticoagulant and antithrombotic agents. Our studies with partially hydrolyzed and chemically sulfated guar gum (hGGSL) showed that this molecule is a galactomannan with M_w of 10.2 kDa, DS of 1.91, and anticoagulant and antithrombotic properties. Compared with *in vitro* unfractionated heparin activity by aPTT, heparin was only 4.5x more efficient than hGGSL and both activities were inhibited in the presence of protamine. Acts by the same serpin-dependent mechanism of action and has its activity inhibited by protamine. Moreover, hGGSL showed to be absorbed when administered by subcutaneous route and was effective in reducing venous thrombosis *in vivo*. Collectively, the results of this study provide a basis for the development of a novel anticoagulant and antithrombotic agent.

Keywords: Guar gum, hemostasis, chemical sulfation, blood coagulation

1. INTRODUCTION

Haemostasis is an important physiological process that prevents bleeding or disseminated blood coagulation. Under normal physiological conditions, the haemostatic system maintains blood circulating in a fluid phase. The imbalance in this process is the origin of many hemorrhagic and ischemic diseases [1, 2]. Thromboembolic complications caused by failures in the haemostasis mechanisms, including arterial and venous thrombosis, are the main cause of morbidity and mortality worldwide [3, 4, 5]. These are multifactorial diseases characterized by excessive formation of clots which differ physiopathologically and in the way of treatment [6]. In broad terms, arterial thrombosis is treated with drugs that target platelets, and venous thrombosis with drugs that target proteins of the coagulation cascade [5].

Currently, in the scenario of anticoagulant and antithrombotic therapy, heparin holds the main role. It is a highly sulfated glycosaminoglycan able to bind to antithrombin (AT) and heparin cofactor II (HCII), potentiating the inhibitory action of these serpins under enzymes involved in blood coagulation, particularly thrombin and factor Xa [7]. Heparin has been used as an anticoagulant and antithrombotic agent for more than 50 years, and is extracted from animal tissues, especially from porcine gut [1]. Structural variations of heparins may occur as a function of the source from where they are obtained and some problems are related to the use of heparin [8]. Due to its high potency of anticoagulant activity, heparin may trigger bleeding, which lead, in some cases, to the need of medical and laboratory monitoring for safe use. In addition, in early 2008, a contamination episode of heparin was associated with anaphylactoid-type reactions, hypotension and death [9].

The situations described above have drawn the attention to a new guideline: the discovery of new anticoagulant and antithrombotic agents as an alternative to heparin, including polysaccharides from non-animal sources, which can be naturally or chemically sulfated [1, 8, 7, 10]. In this context, polysaccharides of plant gums are interesting molecules because of their non-toxicity, low cost and easy availability [11], which already justifies their use in biomedical, pharmaceutical, food and cosmetic industries. Guar gum (GG) is among the most used gums. It is a water-soluble polysaccharide derived from the seeds of *Cyamopsis tetragonolobus*, family Leguminosae [12]. Structurally, GG is a galactomannan with a main chain of (1→4)-

linked β -D-Man_p units, partially substituted at O-6 by terminals of α -D-Galp units, exhibiting a mannose to galactose ratio of about 2:1, and a molecular weight range of 2000 to 3000 kDa. In water, it provides high viscosity solutions, even at low concentrations [13].

Considering the potential of GG, its native and partially hydrolyzed forms were chemically sulfated and evaluated for anticoagulant and antithrombotic activities. Chemical sulfation and partial hydrolysis of GG are justified because the presence of sulfate groups is determinant for the anticoagulant activity of polysaccharides, and reduction of molecular weight decreases the viscosity of GG solutions, facilitating their use for chemical procedures and administration.

2. EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL

Commercial guar gum (GG) was obtained from Sigma (G4129).

2.2 METHODS

2.2.1 Partial Hydrolysis

GG (5 g) was partially hydrolyzed with 0.5 M TFA (600 ml) at 100 °C for 2 h. The solution was neutralized with 10% aq. NaOH, evaporated to 200 ml, dialyzed for 4 days against distilled water using a 6-8 kDa cut-off membrane, and freeze-dried to give the partially hydrolyzed GG (hGG).

2.2.2 Chemical Sulfation

GG and hGG were chemically sulfated according to the methods described by O'Neill (1955) [14] and Larm et al. (1979) [15], both considering some conditions described by Román et al. (2016) [16]. For sulfation by the O'Neill method, chlorosulfonic acid was used as sulfation agent. Each polysaccharide (0.2 g) was solubilized in 20 ml of a mixture of formamide and pyridine (1:1, v/v). Chlorosulfonic acid was added dropwise over 1 h at 0 °C (in a proportion of 18 mols of

chlorosulfonic acid per mol of free hydroxyl in the polysaccharide). The mixtures were maintained at 40 °C for 6 h, then 10% aq. NaHCO₃ was added until the effervescence ceased (final pH = 7.0). The solutions were dialyzed against distilled water using 6-8 kDa cut-off membranes, concentrated and freeze-dried. Chemically sulfated GG and hGG obtained by the O'Neill method were named GGSO and hGGSO. For sulfation by the Larm method, an SO₃-pyridine complex was used as sulfation agent. Each polysaccharide (0.2 g) was solubilized in 10 ml of N,N-dimethylformamide (solution 1), and the SO₃-pyridine complex (in a proportion of 18 mols per mol of free hydroxyl in the polysaccharide) was solubilized in 10 ml of N,N-dimethylformamide (solution 2). Solution 1 was then added to solution 2 and the sulfation reaction was carried out for 6 h at 25 °C. The reactions were stopped with 10% aq. NaHCO₃ until pH 7.0, dialyzed against distilled water using 6-8 kDa cut-off membranes, concentrated and freeze-dried. Chemically sulfated GG and hGG acquired by the Larm method were named GGSL and hGGSL. All samples were kept at -20 °C.

2.2.3 Structural Analysis of Polysaccharides

The molecular weight (M_w) of the polysaccharides was determined by high performance size exclusion chromatography (HPSEC). The peak elution time of each polysaccharide was compared with a calibration curve obtained with standard dextrans of 2000, 487, 266, 124, 72.2, 40.2, 17.2, 9.4, and 5 kDa, from Sigma. HPSEC analyses were performed using four ultrahydrogel columns in series, with exclusion sizes of $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$, and $5 \cdot 10^3$ Da, and a refractive index detector. The eluent was 0.1 M aq. NaNO₂ containing 200 ppm aq. NaN₃ at 0.6 ml/min. Samples and dextrans at a concentration of 1 mg/ml were previously filtered through a 0.22 μm membrane and injected (100 μl loop).

Sugar composition was determined by GC-MS analysis of alditol acetates. The polysaccharides (2 mg) were hydrolyzed in 2 M TFA (1 ml) at 100 °C for 8 h, the solution then evaporated, and the residue dissolved in water (1 ml). Then NaBH₄ (2 mg) was added and, after 12 h, the solution was neutralized with HOAc, evaporated to dryness and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with MeOH [17]. Acetylation was carried out with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 1 ml) for 12 h, at room temperature [18]. The resulting alditol acetates were extracted with CHCl₃,

which was washed four times with 5% aq. CuSO_4 for elimination of residual pyridine. They were analyzed by GC-MS (Varian Saturn 2000R - 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 2000R mass spectrometer), using a DB-225 column (30 m \times 0.25 mm i.d.) programmed from 50 to 220 °C at 40 °C/min, with helium as carrier gas. Components were identified by their typical retention times and electron ionization spectra.

The sulfation pattern was determined by methylation analysis. Before methylation, sulfated polysaccharides were converted in their pyridinium salts, making them soluble in Me_2SO . They were solubilized in water, followed by addition of cation exchange resin (H^+ form), and stirring for 30 min. The solution pH was 1.0 - 2.0. The material was filtered, neutralized with pyridine, and freeze-dried [19]. Polysaccharides or their pyridinium salts (2 mg) were solubilized in Me_2SO (0.5 ml), followed by addition of powdered NaOH (150 mg) and CH_3I (0.5ml) [20]. The mixtures were vigorously shaken for 30 min and then left for 24 h at rest. After neutralization with HOAc , the samples were dialyzed with a 6-8 kDa cut-off membrane and freeze-dried. The per-*O*-methylated polysaccharides were hydrolyzed with 5.5% H_2SO_4 (v/v) for 8 h at 100 °C. The hydrolysates were neutralized with BaCO_3 , filtered, reduced with NaBD_4 and acetylated as described above. The partially *O*-methylated alditol acetates were analyzed by GC-MS using the same conditions described above for alditol acetates, except the final temperature was 215 °C. They were identified by their typical retention times and electron impact spectra [21].

The inorganic sulfate released from acid hydrolysis of the sulfated polysaccharides, with 1 M HCl at 110 °C for 5 h, was quantified by the BaCl_2 -gelatin turbidimetric method, using Na_2SO_4 as standard [22]. Sulfur percentage in the sulfated polysaccharides was calculated from the inorganic sulfate content. Then, the degree of substitution (DS) was obtained according to the equation described by Whistler and Spencer [23], with $\text{DS} = (\text{Y} \cdot \text{S}\%)/(3200 - 102 \cdot \text{S}\%)$, where $\text{Y} = 162.5, 159.2, 161.6$ and 159.6 for GGSO, GGSL, hGGSO and hGGSL, respectively.

2D-NMR HSQC-DEPT correlation maps were obtained with a Bruker 600 MHz AVANCE III NMR spectrometer with a 5 mm inverse gradient probe head (QXI). Analyses were carried out at 50 °C on samples (10 mg) dissolved in D_2O . Chemical shifts were expressed in δ relative to acetone at δ 2.21 (^1H) and 30.2 (^{13}C).

2.2.4 Anticoagulant Activity

Anticoagulant activity was determined with aPTT-SP Hemosil® kit (Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 USA), in a COAG-A-MATE® XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC), using a pool of normal sheep plasma. Plasma (50 μ l) was incubated with unfractionated heparin (6th International Standard) or polysaccharides in saline (50 μ l) at different concentrations at 37 °C. After 60 s, aPTT reagent was added (50 μ l) and incubated for 150 s. Finally, 25 mM CaCl₂ (50 μ l) was added and the clotting time measured (maximum time = 300 s). aPTT was also employed to evaluate the effect of protamine (Sigma) on inhibition of anticoagulant activity of the polysaccharides. In this case, plasma (50 μ l) was incubated for 60 s with 25 μ l of polysaccharide solution (5 μ g/ml) plus 25 μ l of protamine solution (5 μ g/ml). For each test, aPTT mean \pm standard error of mean (SEM) was determined (n = 4).

2.2.5 α -Thrombin And Factor Xa Activities

The assays were performed in 96-well plates. The final concentrations of the reactants were 100 nM antithrombin (AT) or 15 nM heparin cofactor II (HCII), 6 nM α -thrombin or 8 nM factor Xa (Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, VT, USA), 100 μ M chromogenic substrate S-2238 for α -thrombin and S-2222 for factor Xa (Chromogenix AB, Molndal, Sweden), 1 μ g/ml for unfractionated heparin (6th International Standard) and 0.01, 0.1, 1 and 10 μ g/ml of sulfated polysaccharides in TS/PEG buffer (0.02 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, and 1.0 mg/ml polyethylene glycol 8000, pH 7.4). The sulfated polysaccharide, AT or HCII, and α -thrombin or factor Xa (25 μ l each) were incubated for 1 min at 37 °C, then 25 μ l of specific chromogenic substrate were added, and the absorbance at 405 nm was recorded over 15 min in a BioTek™ Epoch™ Microplate Spectrophotometer. The enzymatic activities were calculated from the slope of the linear plot of absorbance, according to what was shown by Roman et al. (2017) [10], which represents the initial velocity of reaction. For each test (n = 3), α -thrombin or factor Xa residual activity, mean \pm standard error of mean (SEM), was determined. Assays without AT and HCII were also performed. In the absence of sulfated polysaccharides, AT and HCII, the α -thrombin and factor Xa activities were considered 100%.

2.2.6 Animals

Experiments were conducted with male Wistar rats (180 - 200 g) from the colony of Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. They were maintained under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycle, temperature 22 ± 2 °C), with standard pellet food and water *ad libitum*. The animals were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (16 mg/kg). The Institutional Ethics Committee of Federal University of Paraná approved all the procedures adopted in this study (authorization number 1038).

2.2.7 *Ex Vivo* aPTT

Citrated blood samples were collected (0.6 ml of blood in 60 μ l of 3.8% sodium citrate) from the carotid artery 60, 120 and 180 min after subcutaneous administration (dorsal region) of 2 ml of vehicle (PBS), clexane (5 and 20 mg/kg) or sulfated polysaccharides (5, 10 and 20 mg/kg), according to what was shown by Barddal et al. (2015) [1]. After dorsal administration of samples (40 min), the animals (n = 3 per group) were anesthetized for cannulation of the right carotid artery for blood collection. Then, the blood was centrifuged at 2000 rpm for 10 min to obtain the citrated plasma. In order to determine the aPTT, plasma (50 μ l) was incubated at 37 °C for 60 s. After that, aPTT reagent was added (50 μ l) and incubated for 150 s. Finally, 25 mM CaCl₂ (50 μ l) was added and the clotting time measured (maximum time = 300 s). For each test, the aPTT mean \pm standard error of mean (SEM) (n = 4) was determined.

2.2.8 Venous Thrombosis

Thrombus formation was induced by promoting a combination of stasis and hypercoagulability by a modification of the method described by Vogel et al. (1989) [24]. Rats were anesthetized as described above, and their right carotid artery was exposed and cannulated for injection of vehicle (PBS), sulfated polysaccharides (1, 3 e 5 mg/kg) or unfractionated heparin (6th International Standard) (0.2 mg/kg), and thromboplastin (5 mg/kg). The abdominal vena cava was carefully dissected, and

loose sutures were placed between the right renal vena and femoral veins, and in the left renal vena. Vehicle, sulfated polysaccharides, or unfractionated heparin, were infused into the right carotid artery and allowed to circulate for 5 min. Thrombus formation was then induced by injection of thromboplastin and, 20 s later, by stasis of a 0.7 cm segment of the abdominal vena cava. After 20 min, the thrombus formed inside the occluded segment was carefully pulled out, washed with PBS, freeze-dried and weighed. For each group ($n = 6$), the thrombus weight (mean \pm SEM) was determined and then expressed as percentage of thrombus weight, 100% representing the absence of any inhibition of thrombus formation (thrombus weight with PBS).

2.2.9 Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and statistical significance of the results was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, using Graphpad Prism 5 software. Data were considered statistically different at a significance level of $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 PRELIMINARY STRUCTURAL ANALYSIS OF POLYSACCHARIDES

Since GG is a polysaccharide with a very high molecular weight (> 2000 kDa), which provides high viscosity solutions, it was submitted to partial acid hydrolysis in order to obtain lower molecular weight and more soluble fragments. From 5 g of GG, 870 mg of the partially hydrolyzed galactomannan were obtained, named hGG ($M_w < 5$ kDa). HPSEC analysis showed that the molecular weight values of both GG and hGG were outside the calibration curve range used for molecular weight determination. Besides the lower molecular weight, hGG also showed a higher mannose to galactose ratio (1.9:1) than GG (1.6:1), indicating that the partial acid hydrolysis removed terminals of galactose.

GG (0.2 g) and hGG (0.2 g) were chemically sulfated by the O'Neill (SO) and Larm (SL) methods, resulting in GGSO (0.22 g), GGSL (0.18 g), hGGSO (0.35 g) and hGGSL (0.38 g), which had a sulfur content of 13.88% (DS = 1.26), 6.10% (DS =

0.38), 13.61% (DS = 1.21), 17.26% (DS = 1.91), respectively. The chemical sulfation procedures did not change the mannose to galactose ratio observed for GG and hGG, but they caused changes in the molecular weights. Interestingly, while GGSO and GGSL had a lower molecular weight compared to GG, hGGSO and hGGSL had a higher molecular weight compared to hGG (Figure 1). The polysaccharide fragments resistant to the partial acid hydrolysis (hGG) were resistant to degradation by the chemical sulfation procedures, showing an increase in the molecular weight by the addition of sulfate groups in the polymer.

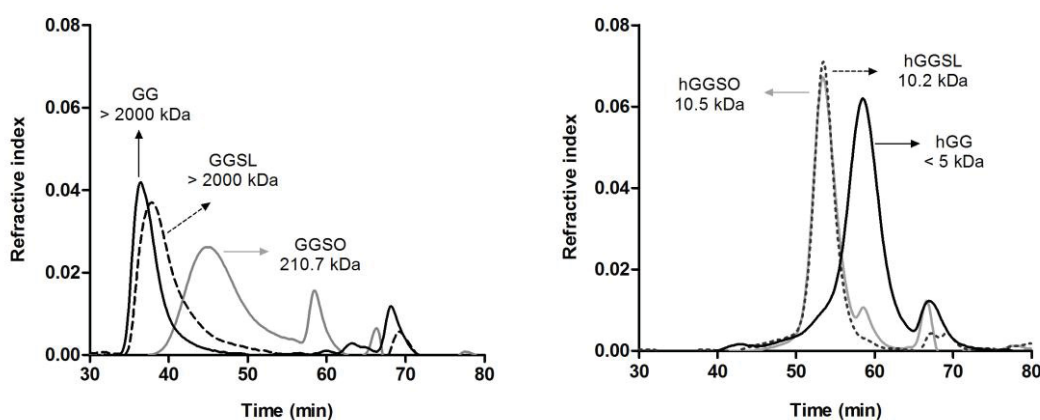


FIGURE 1 - HPLC ELUTION PROFILES OF THE NON-SULFATED AND SULFATED POLYSACCHARIDES

LEGEND: GG commercial guar gum; hGG: partially hidrolized GG; GGSL: GG sulfated by Larm method; GGSO: gg sulfated by O'Neill method; hGGSL: hGG sulfated by Larm method; hGGSO: hGG sulfated by O'Neill method.

NOTES: M_w was determined by comparison with a calibration curve obtained with standard dextrans of 5 – 2000 kDa.

3.2 ANTICOAGULANT ACTIVITY IN VITRO AND MECHANISM OF ACTION

Anticoagulant activity of the polysaccharides was determined by evaluating their property of increasing aPTT of sheep plasma (Figure 2). The dose-response effects of GGSO, GGSL, hGGSO, hGGSL, and heparin were evaluated through models of linear regression. For each increase of 1 $\mu\text{g/ml}$ in the concentration of GGSO, GGSL, hGGSO, hGGSL, and heparin, aPTT increased about 0.03, 0.21, 0.25, 14.69, and 66.74 s (see the angular coefficients of the equations in Figure 2). These results showed that hGGSL was about 490, 70 and 59 times more potent than GGSO, GGSL and hGGSO, respectively, and only 4.5 times less potent than heparin. The higher DS associated with the lower molecular weight probably

contributed to the greater anticoagulant activity of hGGSL. Non-sulfated polysaccharides did not affect aPTT, indicating that sulfate groups are essential for anticoagulant activity.

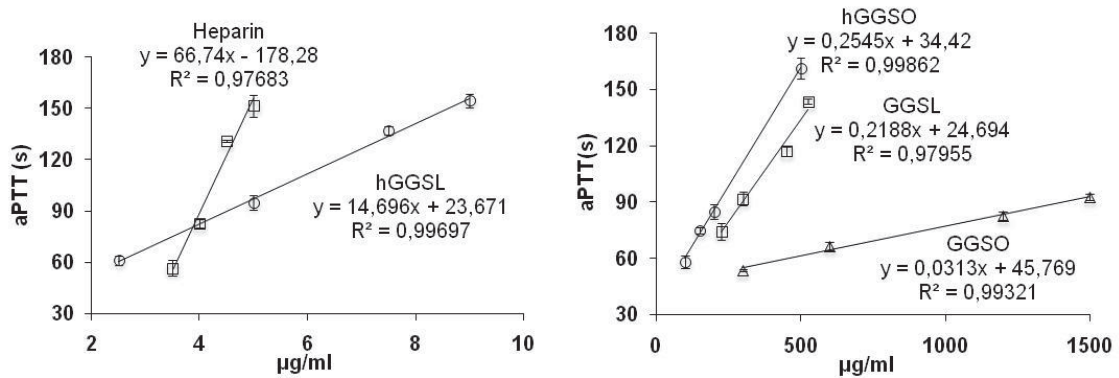


FIGURE 2 - EFFECT OF THE SULFATED POLYSACCHARIDES ON aPTT OF CITRATED SHEEP PLASMA

NOTES: aPTT in the absence of polysaccharides was $22,33 \pm 0,9$ s. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 4).

The polysaccharides GGSO, GGSL and hGGSO showed very low anticoagulant activity, and those sulfated by the O'Neill method (GGSO and hGGSO) were unstable under storage conditions. After 30 days, they darkened and the solutions obtained from them started to present acidic pH. These two situations are consistent with desulfation, followed by formation of sulfuric acid and subsequent hydrolysis of the polysaccharide. For these reasons, GGSO, GGSL and hGGSO were not used in subsequent experiments.

Just as important as finding an anticoagulant agent is finding a compound that can reverse its effect in overdose situations, preventing bleeding in patients. Protamine has long been used as an antidote for patients using heparin and it has already been shown that it may also inhibit the anticoagulant effect of other sulfated polysaccharides [1]. It is a protein extracted from the sperm of several salmon species, with a high arginine ratio, being positively charged in physiological conditions, which allows its complexation with the sulfate groups of heparin and other polysaccharides [25]. In the presence of an equal concentration of protamine, the effect of hGGSL on aPTT of sheep plasma was reduced by 44% (Figure 3).

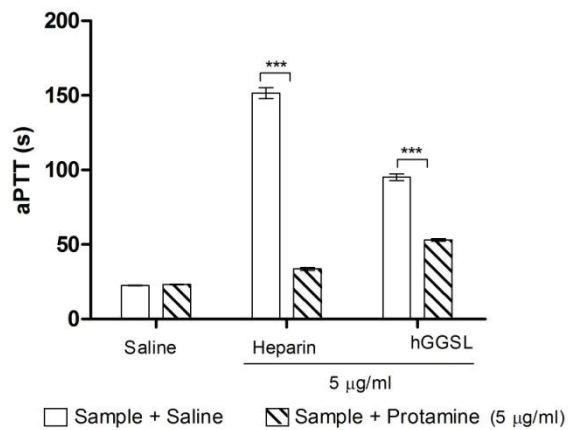


FIGURE 3 - EFFECT OF PROTAMINE ON THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF hGGSL
 NOTES: Citrated sheep plasma was incubated with hGGSL or heparin in the absence or in presence of protamine. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 4), with $p < 0.001^{***}$.

The study of the anticoagulant mechanism of hGGSL was based on the mechanism of action of heparin, which binds to antithrombin (AT) and heparin cofactor II (HCII), potentiating the action of these serpins under thrombin (FIIa) and of AT under factor Xa (FXa). The effect of hGGSL on FIIa and FXa activities in the presence or absence of serpins (natural inhibitors) was evaluated (Figure 4).

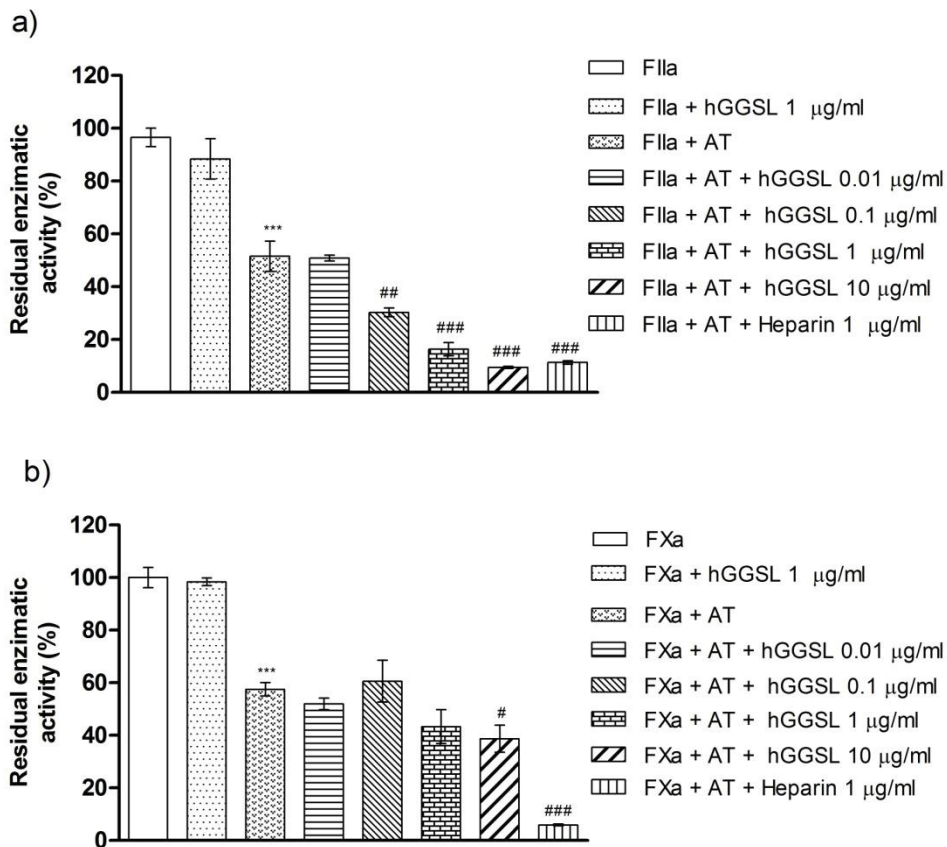


FIGURE 4 - EFFECT OF hGGSL ON FIIa (A) AND FXa (B) ACTIVITIES

NOTES: 6 nM of α -thrombin (FIIa) or 8 nM FXa and 100 nM AT were incubated with 1 µg/ml of hGGSL or heparin. After 1 min at 37 °C, 100 µM of specific chromogenic substrate were added, and α -thrombin or factor Xa activity expressed as a proportion of absorbance at 405 nm (mean \pm SEM, n = 3), with 100% of activity considered to be that occurring without addition of the polysaccharide and serpin (AT). $p < 0.001^{***}$, when compared with the reaction without the polysaccharide and serpins. $p < 0.05^{\#}$, $p < 0.01^{##}$ and $p < 0.001^{###}$ when compared with the reaction in presence of enzyme and serpin.

FIIa activity decreased to 51.5% only with the presence of AT. However, when heparin or hGGSL (1 µg/ml) were incubated with AT, FIIa activity decreased to only 11.3% and 16.3% respectively (Figure 4a). The effect of hGGSL in the absence of AT was also evaluated. However, it had no effect, indicating that hGGSL acts as FIIa inhibitor only in the presence of AT. In the presence of HCII, both heparin and hGGSL did not inhibit FIIa at the concentrations tested (data not shown).

FXa activity decreased to 57.4% only with the presence of AT, and when heparin (1 µg/ml) was incubated together, FXa activity decreased to only 5.9%. However, hGGSL was able to inhibit FXa only at 10 µg/ml, decreasing FIIa activity to 38.7% (Figure 4b). The effect of hGGSL in the absence of AT was also performed. However, it had no effect, indicating that hGGSL acts as a FXa inhibitor only in the presence of AT.

The high anti-FIIa and anti-FXa activity of heparin in the presence of AT is due to a specific pentasaccharide sequence of heparin, which binds to AT, allowing formation of a complex and, consequently, the binding of this with FIIa and FXa [26]. The inhibitory effect of heparin by HCII is not dependent of the specific pentasaccharide sequence, and occurs only when high concentrations of heparin are used [27]. According to our results, hGGSL enhanced anti-FIIa and anti-FXa activities of AT, possibly through formation of a ternary complex, in the same way that occurs with heparin.

3.3 ANTITHROMBOTIC ACTIVITY

The antithrombotic effect of hGGSL was investigated in rats by the stasis-induced venous thrombosis model. In vehicle-treated rats, the average thrombus weight was 4.48 ± 0.46 mg (mean \pm SD, n=6), which corresponded to 100% thrombosis. hGGSL inhibited thrombus formation in a dose-dependent manner, achieving 62% and 96% inhibition at doses of 3 and 5 mg/kg, respectively. The positive control heparin, at 0.2 mg/kg, inhibited thrombus formation by 42% (Figure 5).

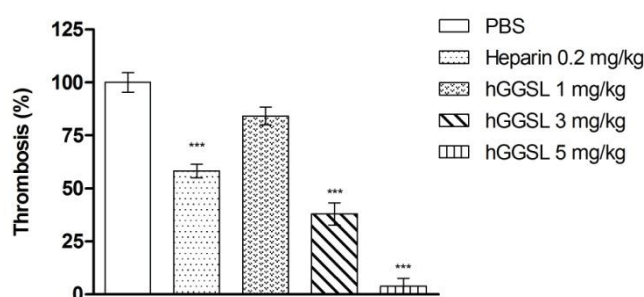


FIGURE 5 - *IN VIVO* ANTITHROMBOTIC EFFECT OF hGGSL

NOTES: PBS, heparin, or hGGSL were administered in the right carotid artery and allowed to circulate for 5 min. Thromboplastin (5 mg/kg body weight) was then injected, and 20 s later, 0.7 cm of an isolated segment of the abdominal vena cava was tied off. After stasis for 20 min, the thrombus formed inside this segment was pulled out, freeze-dried and weighed. Results are expressed as % of thrombus weight (mean \pm SEM n = 6), with 100% representing absence of any thrombosis inhibition (thrombus weight in the PBS group). $p < 0.001$ *** when compared with PBS group.

3.4 *EX VIVO* ANTICOAGULANT ACTIVITY

The aim of assessing *ex vivo* aPTT is to check the absorption of the drug when administered subcutaneously. The increase in aPTT in animals that received

the drug is a proof that it is absorbed. The aPTT of the negative control group (PBS) was 18.65 ± 0.55 s (mean \pm SEM), for blood collected 60 min after PBS administration. The positive control group, which received clexane at a dose of 20 mg/kg, showed an increase of aPTT of 2.5 times compared to the PBS group. hGGSL showed a dose-dependent effect, increasing 3.4, 4.5 and 8.0 times the aPTT, at doses of 5, 10 and 20 mg/kg respectively, compared to the PBS group (Figure 6). Low molecular weight heparins like clexane are good alternatives for the treatment of venous thromboembolism. They can be administered subcutaneously, give little variability in coagulation response and have a better bioavailability than unfractionated heparins [28, 29, 30, 31]. Thus, hGGSL can be a good alternative to low molecular weight heparins, since its anticoagulant effect was greater than that of clexane after subcutaneous administration, suggesting a high bioavailability of hGGSL when administered by this route.

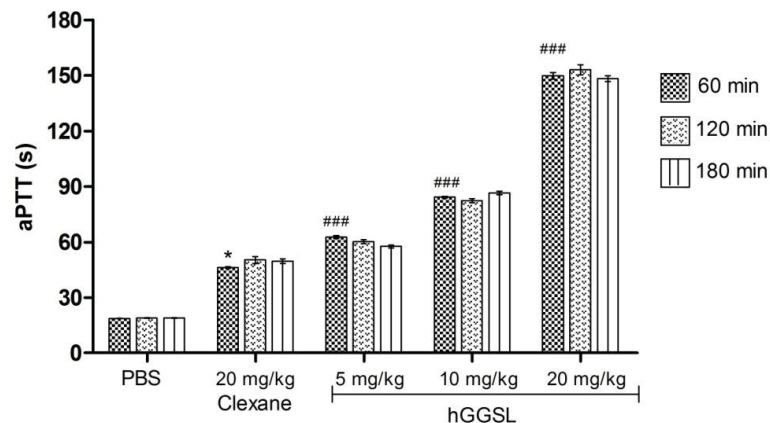


FIGURE 6 - *EX VIVO* APTT AFTER SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF hGGSL

NOTES: aPTT of blood collected 60 s after subcutaneous administration of PBS, clexane or hGGSL. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 3 animals per group; for each animal, aPTT was evaluated in quadruplicate). $p < 0.001$ *** when compared with PBS and $p < 0.001$ ### when compared with clexane.

aPTT was also performed with blood collected 120 s and 180 s after subcutaneous injection of hGGSL. However, the results did not present statistical difference in relation to the data obtained with blood collected 60 s after polysaccharide administration (data not shown), which show an extended anticoagulant effect of hGGSL.

3.5 SULFATION PATTERN OF hGGSL

The sulfation pattern of hGGSL was determined by methylation analysis (Table 1). A methylated derivative obtained from a sulfated polysaccharide allows the identification of a sulfation site when this derivative is absent or in lower proportion in the analysis of the non-sulfated polysaccharide. The results indicated that the mannose and galactose units in hGGSL are practically oversulfated, according to the presence of 53% of Man β and 36% of Gal β on methylation analysis. The appearance of the 2,3-Me $_2$ -Man β derivative (3%) in the methylation analysis of hGGSL may be due to sulfation or the presence of non-reducing end-units of Gal β in 6-O position of the Man β residues of the main chain. Moreover, the appearance of 2- and 3-Me-Gal β (5% and 3%, respectively), are due to sulfation of 3,4,6-O and 2,4,6-O positions, respectively, of the non-reducing end-units of Gal β .

TABLE 1 - PROFILE OF O-METHYLATED ALDITOL ACETATES OBTAINED BY METHYLATION ANALYSIS OF GG, hGG E hGGSL.

O-methylated alditol acetate	% Relative to total peak area ^a		
	GG	hGG	hGGSL
2,3,6-Me $_3$ -Man β	39	52	-
2,3-Me $_2$ -Man β	26	26	3
Man β	-	-	53
2,3,4,6-Me $_4$ -Gal β	35	22	-
2-Me-Gal β	-	-	5
3-Me-Gal β	-	-	3
Gal β	-	-	36

^a Values < 1% were not included.

The results of methylation analysis also confirmed the guar gum structure. Because of the presence of 2,3,6-Me $_3$ -Man β , 2,3-Me $_2$ -Man β and 2,3,4,6-Me $_4$ -Gal β derivatives, GG and hGG are galactomannans with a main chain of (1 \rightarrow 4)-linked β -D-Man β units, partially substituted at O-6 by terminals of α -D-Gal β units, as previously described.

The DS of 1.91 presented by hGGSL was consistent with the methylation analysis, which revealed the presence of oversulfated mannose and galactose units. The high insertion of sulfate groups could also be observed by comparison of the HSQC analysis of hGG and hGGSL (Figure 7), since practically all $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations of the ring region (60 to 80 ppm of ^{13}C) were shifted in hGGSL (black

and gray correlations).

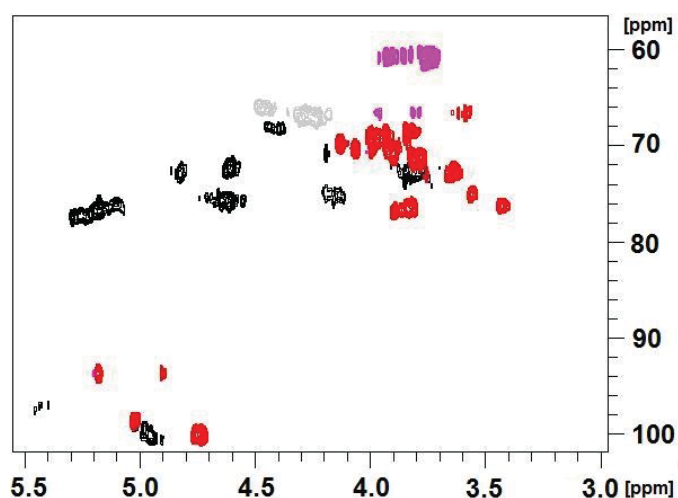


FIGURE 7 - $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -HSQC ANALYSIS.
 LEGEND: hGG (red and pink) and hGGSL (black and gray) in D_2O at 50°C .

4. CONCLUSIONS

hGGSL, a chemically sulfated polysaccharide with a molecular weight of 10.2 kDa, obtained after partial acid hydrolysis and chemical sulfation of guar gum, showed excellent anticoagulant activity *in vitro*, which could be inhibited by protamine. The anticoagulant effect of hGGSL is serpin-dependent and is mainly related to inhibition of FIIa via AT. Moreover, hGGSL was able to reduce venous thrombosis and showed better bioavailability than clexane when administered subcutaneously. Given the results obtained, hGGSL is a very interesting and promising drug, which should be better investigated in the field of anticoagulant and antithrombotic agents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian agencies *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq – Grant number 449176/2014-2), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and *Financiadora de Estudos e Projetos* (FINEP) for financial support; Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos (CTEFAR), from Universidade Federal de Santa Maria, for supplying ovine plasma; and UFPR-RMN Center.

5. REFERENCES

- [1] H.P.O. Barddal, A.H. Gracher, F.F. Simas-Tosin, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolucuronomannan after chemical sulfation, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.051>.
- [2] R. Caterina, S. Husted, L. Wallentin, F. Andreotti, H. Arnesen, F. Bachmann, C. Baigent, K. Huber, J. Jespersen, S.D. Kristensen, G.Y.H. LIP, J. Morais, L.H. Rasmussen, A. Siegbahn, F.W.A. Verheugt, J.I. Weitz, General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). Position Paper of the ESC Working Group on Thrombosis – Task Force on Anticoagulants in Heart Disease, *Thromb. Haemost.* 109 (2013) 569-579. <https://doi.org/10.1160/TH12-10-0772>.
- [3] Z. Chen, D. Seiffert, B. Hawes, Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy, *Drug Discov. Today.* 19 (2014) 1435-1439. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.018>.
- [4] J.A. Heit, Epidemiology of venous thromboembolism, *Nat. Rev. Card.* 12 (2015) 464-474. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.83>.
- [5] N. Mackman, Triggers, targets and treatments for thrombosis, *Nature.* 451 (2008) 914-918. <https://doi.org/10.1038/nature06797>.
- [6] B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 34-45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>.
- [7] N.C. Maas, A H.P. Gracher, G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 1081-1087. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.070>.
- [8] C. Araújo, M.D. Nosedá, T.R. Cipriani, A.G. Gonçalves, M.E. Duarte, D.R.B. Ducatti, Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 483-491. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.034>.
- [9] H. Liu, Z. Zhang, R.J. Linhardt, Lessons learned from the contamination of heparina, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 313-321. <https://doi.org/10.1039/b819896a>.
- [10] Y. Roman, H.P.O. Barddal, M. Iacomini, G.L. Sasaki, T.R. Cipriani, Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin, *Carbohydr. Polym.* 174 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.110>.

- [11] V.P. Prajapati, G.K. Jania, N.G. Moradiyaa, N P. Randeriaa, B.J. Nagarb, N.N. Naikwadia, B.C. Variyac, Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide, *Int. J. Biol. Macromol.* 60 (2013) 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.017>.
- [12] S. Das, U. Subuddhi, pH-Responsive guar gum hydrogels for controlled delivery of dexamethasone to the intestine, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 856-863. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.008>.
- [13] S. Gupta, C.K. Saurabh, P.S. Variyar, A. Sharma, Comparative analysis of dietary fiber activities of enzymatic and gamma depolymerized guar gum, *Food Hydrocoll.* 48 (2015) 159-154. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.013>.
- [14] N.A. O'Neill, Sulphated derivatives of laminaran, *Can. J. Chem.* 33 (1955) 1097-1101. <https://doi.org/10.1139/v55-127>.
- [15] O. Larm, K. Larsson, E. Scholander, The preparation of a heparin analogue from alginic acid, *Carbohydr. Res.* 73 (1979) 332-336. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85511-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85511-1).
- [16] Y. Roman, M. Iacomini, G.L. Sasaki, T.R. Cipriani, Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan, *Carbohydr. Pol.* 146 (2016) 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.061>.
- [17] M.L. Wolfrom, A. Thompson, Reduction with borohydride, in: R.L. Wistler, M. L., Wolfrom (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, 1963a, pp. 65-67.
- [18] M.L. Wolfrom, A. Thompson, Acetylation, in: R.L. Wistler, M.L. Wolfrom (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, 1963b, pp. 211-215.
- [19] K. Nagasawa, Y. Inoue, T. Tokuyasu, An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates, *J. Biochem.* 86 (1979) 1323-1329. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/86/5/86_5_1323/_article.
- [20] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 209-217. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8).
- [21] G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin, L.M. Souza, P.A. Czelusniak, M. Iacomini, Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 731-739. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.020>.
- [22] K.S. Dodgson, R.G. Price, A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides, *Biochem. J.* 84 (1962) 106-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1243628/>.

- [23] R.L. Whistler, W.W. Spencer, Sulfation, in: R.L. Wistler, R. J. Smith, J. N. BeMiller, M. L. Wolfrom (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York/London, 1964, pp. 297-298.
- [24] G.M.T. Vogel, D.G. Meuleman, F.G.M. Bourgondien, P.M.J. Hobbelen, Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans, *Thromb. Res.* 54 (1989) 399-410. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(89\)90210-7](https://doi.org/10.1016/0049-3848(89)90210-7).
- [25] F.N. Ainle, R.J.S. Preston, V.P. Jenkins, H.J. Nel, J.A. Johnson, O.P. Smith, B. White, P.G. Fallon, J.S. O'Donnell, Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation, *Blood* 114 (2009) 1658–1665. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222109>.
- [26] U. Lindahl, G. Bäckström, M. Höök, L. Thunberg, L.A. Fransson, A. Linker, Structure of the antithrombin-binding site in heparin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 -7 (1979) 3198-3202. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC383791/>.
- [27] D.M. Tollefsen, Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. *Arterioscler, Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 454-460. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000256471.22437.88>
- [28] P.A.S. Mourão, M.S. Pereira, Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates, *Trends Cardiovasc. Med.* 9 (1999) 225-232. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(00\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00032-3).
- [29] S.A. Mousa, Heparin, low molecular weight heparin, and derivatives in thrombosis, angiogenesis, and inflammation: emerging links, *Semin. Thromb. Hemost.* 33 (2007) 524-533. <https://doi.org/10.1055/s-2007-982084>.
- [30] J. Hirsh, M.N. Levine, Low-molecular-weight heparin, *Blood.* 79 (1992) 1-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309422>.
- [31] J.I. Weitz, Low-molecular-weight heparins, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 688-698. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709043371007>.

ARTIGO II

(Manuscrito a ser enviado para International Journal of Biological Macromolecules)

Evaluation of the hydrolyzed and chemically sulfated guar gum as an anticoagulant for *in vivo* use and for blood collection

Helyn Priscila de Oliveira Barddal^a, Yony Román Ochoa ^a, Alexandra Acco^b, Maria Carolina Stipp^b, Olair Carlos Beltrame^c, Rosangela Locatelli Dittrich^c, Thales Ricardo Cipriani^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, CP 19.046, CEP 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.

^b Department of Pharmacology, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil.

^c Department of Veterinary Medicine, Federal University of Parana, PR, Brazil.

* Corresponding author. E-mail address: trcipriani@ufpr.br

ABSTRACT

In a previous work was demonstrated that the partially hydrolyzed and chemically sulfated guar gum, named hGGSL, has anticoagulant and antithrombotic properties. Moreover, hGGSL showed to be absorbed when administered by subcutaneous route in rats. The objective of the present study is to verify if hGGSL has potential to be used, i.e. to verify if it causes any adverse effect during continuous use and, in addition, if it can be used as anticoagulant in blood collection to perform blood count and biochemical analyses. The animals were subcutaneously treated with PBS or hGGSL for 14 days. Then, blood was collected for complete blood count, biochemical and acute phase proteins analyses. Lungs, kidneys, spleen and liver were also collected and weighted, and only the liver histologically evaluated. The results showed that hGGSL did not cause any inflammatory response and was still able to reduce glucose and triglycerides levels. Moreover, there was no difference between the organs weight in the animals treated with PBS or hGGSL, and histological analysis of the liver supported the absence of inflammatory processes or hepatotoxicity. Despite the promising results in the evaluation of the continuous *in vivo* use of hGGSL, it was not shown to be efficient as anticoagulant for blood collection. Blood samples were collected with heparin or hGGSL and analyzed in clinical laboratory. Alterations in some hematological and in most of the

biochemical parameters were visualized in the samples collected with hGGSL. Therefore, hGGSL appears to be a promising anticoagulant agent for use only.

Keywords: Guar gum, continuous use, chemical sulfation, subcutaneous route.

1. INTRODUCTION

Some anticoagulants can be used both, for the treatment of hypercoagulation disorders, and *in vitro*, for blood collection, making it possible to carry out some analyses in clinical laboratory.

Treatment of diseases related to blood hypercoagulation, being for post-surgical or physiopathology reasons. Is mainly done with the application of anticoagulants as heparin (UFH – unfractionated heparin or LMWH – low molecular weight heparin). However, treatment with heparin may cause adverse effects, such as bleeding, thrombocytopenia, osteoporosis, allergic reactions and hepatic dysfunction [1]. In addition, UFH is also an anticoagulant used in blood collections.

Heparin is widely used as an anticoagulant and antithrombotic agent. It is a glycosaminoglycan, with a complex pattern of substitution of sulfate groups, which is directly related to its pharmacological properties. In search of alternatives to heparin, several studies have been carried out with chemically sulfated polysaccharides [3, 4, 5, 6, 7, 8] In relation to this, in a previous work, we demonstrated that the partially hydrolyzed and chemically sulfated guar gum, named hGGSL, has anticoagulant and antithrombotic properties. Moreover, hGGSL showed to be absorbed when administered by subcutaneous route in rats (data not yet published – Article I). Now, the objective of the present study is to verify if hGGSL has potential to be used i.e. to verify if it causes any adverse effect during continuous use in rats and, in addition, if it can be used as anticoagulant in blood collection to perform blood count and biochemical analyses.

Analysis of biochemical and hematological components in blood is used to monitor the adverse effects caused by drugs in development phase or even for drugs released for clinical practice. Due to the sensitivity and response to toxic compounds, the biochemical blood profile and blood count, provides information about the body's response to injury or stress [9]. In addition, evaluation of acute

phase proteins and organs such as lungs, kidneys, spleen and liver can also provide information on inflammatory processes or tissue-specific reactions.

2. EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALS

Commercial guar gum (GG) was obtained from Sigma (G4129) and used to produce the partially hydrolyzed and chemically sulfated guar gum (hGGSL), according to Barddal et al. (2019) (data not yet published – Article I). Rat HP (Haptoglobin) ELISA kit (E-EL-R0473) and rat CRP (C-reactive protein) ELISA kit (E-EL-R0022) were from Elabscience (USA).

2.2 METHODS

2.2.1 Animals

Experiments were conducted with male Wistar rats from the colony of Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. They were maintained under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycle, temperature 22 ± 2 °C), with standard pellet food and water *ad libitum*.

For the blood collection assay, the animals were anesthetized with an intramuscular injection before beginning the blood collection process. For the *in vivo* use continuous assay, the animal were anesthetizes with an intraperitoneal injection on the last day of experimentation for collection of organs and blood. Both injections were a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (16 mg/kg).

The Institutional Ethics Committee of Federal University of Parana approved all the procedures adopted in this study (authorization number 1137).

2.2.2 Evaluation of hGGSL as Anticoagulant in Blood Collection (Blood Collection Assay)

Wistar rats with approximately 220g (n = 7) were anesthetized as described above, and their right carotid artery was exposed and cannulated for blood

collections using a heparinized syringe and another syringe containing 10 µl of hGGSL solution at 25 mg/ml - higher soluble concentration - (2 ml of blood in each syringe). The anticoagulated blood samples were then used to perform blood count and biochemical analyses.

2.2.3 Continuous use of hGGSL (Continuous use Assay)

Wistar rats with approximately 120 g initially were divided into two groups (n = 8 per group), which received PBS (200µl) or hGGSL (5 mg/kg - subcutaneously absorbed concentration and anticoagulant action - unpublished data, Article I) subcutaneously, in the dorsal part, once a day for 14 days. From the 14th to the 15th day, the feed was withdrawn to induce fasting state (12h). On the 15th day, the animals were anesthetized intraperitoneally as described above, and their inferior vena cava was surgically exposed for blood collection (4 ml) with a heparinized syringe (2 ml for blood count and biochemical analyses, and 2 ml for ELISA tests for acute phase proteins).

In addition, the lungs, kidneys, spleen and liver were also collected for weighing. Of these, only the liver was to histological analysis.

2.2.4 Blood Count and Biochemical Analyses

The blood obtained from the blood collection assay and continuous use assay were immediately sent to the clinical laboratory of the Veterinary Hospital of the Federal University of Parana to perform blood count and biochemical analyses.

The hematological parameters analyzed were: WBC (white blood cell), Lym (lymphocytes), Mon (monocytes), Gran (granulocytes), RBC (red blood cell), hemoglobin, HCT (hematocrit level), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), RDW (red cell distribution width), platelets, MPV (mean platelet volume), PDW (platelet distribution width), PCT (plateletcrit). The analyses were performed on the auto hematology analyzer Mindray BC-2800Vet.

The biochemical parameters analyzed in the plasma were: triglycerides, total cholesterol, HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol), LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol), VLDL-C (very low-density lipoprotein cholesterol), ALT

(alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), FA (alkaline phosphatase), glucose, total proteins, albumin, globulins, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, creatinine, and urea. The analyses were performed on the chemistry analyzer Mindray BS-200, using commercial kits (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil), following the manufacturer's specification.

2.2.5 ELISA Tests for a Cute Phase Proteins

A portion of the blood collected in the continuous use assay was used for measurement of murine acute phase proteins. The heparinized blood samples were centrifuged at 1000 x g, at 4 °C for 15 min, the plasma was collected and used for the quantification of rat haptoglobin and rat C-reactive protein, using specific ELISA kits, following the manufacturer's specifications.

2.2.6 Organs Analysis

The organs collected in the continuous use assay (lungs, kidneys, spleen and liver) were weighed and only the liver was examined histologically.

Parts of the liver were fixed in 10% formaldehyde at room temperature, for 24 h. The samples were then dehydrated in ethanol and xylol, embedded in paraffin, sectioned into 4 mm thick slices, stained with hematoxylin/eosin and analyzed under a microscope. The histological parameters analyzed were cytological characteristics, apoptosis, and lymphocytic infiltration.

The images were obtained using Olympus BX51 microscope (Olympus System Microscope), equipped with DP72 camera, with Cell^F software (2098, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

2.2.7 Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and the statistical significance of the results was determined using unpaired *t*-test, using the GraphPad Prism 5.0. Data were considered statistically different at a significance level of $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 EVALUATION OF HGGSL AS ANTICOAGULANT IN BLOOD COLLECTION (BLOOD COLLECTION ASSAY)

3.1.1 Blood count

Complete blood count is used to measure different parts and features of the blood, including red cells, white cells, platelets, hemoglobin, etc. In order to perform this type of analysis the blood must be in the presence of some anticoagulant agent, which preferably does not influence the results. In this study, the use of hGGSL as anticoagulant for complete blood count determination was evaluated, comparing the results with those obtained in the presence of heparin (Table 1). With the exception of some white blood cell parameters and platelets, blood count results were similar for samples collected in the presence of heparin and hGGSL. The number of monocytes and granulocytes in the samples collected with hGGSL was lower, which also negatively influenced the total number of white cells.

TABLE 1 - COMPLETE BLOOD COUNT OF RAT'S BLOOD COLLECTED WITH HEPARIN OR hGGSL

Parameter	Heparin	hGGSL
WBC (x 10 ³ /μl)	7.21 ± 0.27	5.96 ± 0.38*
Lym (x 10 ³ /μl)	5.41 ± 0.21	4.78 ± 0.25
Mon (x 10 ² /μl)	0.18 ± 0.01	0.11 ± 0.01**
Gran (x 10 ³ /μl)	1.61 ± 0.07	1.06 ± 0.13**
RBC (x10 ⁶ /μl)	6,96 ± 0.14	6.82 ± 0.11
Hemoglobin (g/dl)	12.20 ± 0.20	12.24 ± 0.21
HCT (%)	38.61 ± 0.72	37.68 ± 0.49
MCV (fl)	55.61 ± 0.35	55.37 ± 0.52
MCH (pg)	17.50 ± 0.13	17.90 ± 0.22
MCHC (g/dl)	31.56 ± 0.16	32.43 ± 0.54
RDW (%)	12.99 ± 0.32	12.83 ± 0.31
Platelets (x 10 ³ /μl)	225.3 ± 15.71	156.3 ± 11.77**
MPV (fl)	6.91 ± 0.10	7.09 ± 0.14
PDW (%)	15.73 ± 0.12	15.67 ± 0.08
PCT (%)	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.02

LEGEND: WBC (white blood cell), Lym (lymphocytes), Mon (monocytes), Gran (granulocytes), RBC (red blood cell), HCT (hematocrit level), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular haemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), RDW (red cell distribution width), MPV (mean platelet volume), PDW (platelet distribution width), PCT (plateletcrit).

NOTES: Results are expressed as mean \pm SEM (n = 7) with p < 0.05* and p < 0.01** when compared to the heparin group.

3.1.2 Biochemical analyses

In clinical laboratories, anticoagulated blood can also be used to obtain plasma for biochemical analysis, including determination of lipid profile, glycemia, plasma proteins, markers of organ function, etc. The use of hGGSL as anticoagulant for biochemical analysis was also evaluated, comparing the results with those obtained in the presence of heparin (Table 2). Differently from what was observed in the blood count analyses, in the biochemical analyses many parameters showed significant differences when analyzed in the presence of hGGSL and heparin. These differences may be due, for example, to interferences of hGGSL in the biochemical reactions arising from its interaction with plasma components and/or with components of the kits used in the biochemical analyses. Therefore, hGGSL does not appear to be an appropriate anticoagulant for obtaining plasma for biochemical analyses.

TABLE 2 - BIOCHEMICAL ANALYSES OF RAT'S BLOOD COLLECTED WITH HEPARIN OR hGGSL.

Parameter	Heparin	hGGSL
Triglycerides (mg/dl)	85.99 \pm 2.61	76.80 \pm 2.58*
Total Cholesterol (mg/dl)	87.96 \pm 2.32	95.07 \pm 6.02
HDL-C (mg/dl)	45.26 \pm 2.43	35.16 \pm 2.28*
LDL-C (mg/dl)	25.50 \pm 2.64	45.39 \pm 7.24*
VLDL-C (mg/dl)	17.20 \pm 0.53	14.66 \pm 0.84*
ALT (U/l)	54.15 \pm 1.41	59.84 \pm 3.18
AST (U/l)	256.93 \pm 7.57	348.54 \pm 35.50*
FA (U/l)	124.30 \pm 11.03	106.30 \pm 15.15
Glucose (mg/dl)	254.83 \pm 8.64	244.97 \pm 8.08
Total Proteins (mg/dl)	5.21 \pm 0.10	4.74 \pm 0.11*
Albumin (mg/dl)	3.47 \pm 0.08	3.74 \pm 0.16
Globulin (mg/dl)	1.76 \pm 0.14	1.00 \pm 0.20**
Total bilirubin (mg/dl)	21.88 \pm 2.87	47.11 \pm 9.33*
Direct bilirubin (mg/dl)	2.09 \pm 0.20	4.25 \pm 0.59**
Indirect bilirubin (mg/dl)	20.94 \pm 2.04	42.71 \pm 8.86*
Creatinine (mg/dl)	0.59 \pm 0.01	0.50 \pm 0.007***
Urea (mg/dl)	53.37 \pm 2.87	54.39 \pm 2.30

LEGEND: HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol), LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol), VLDL-C (very low-density lipoprotein cholesterol), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), FA (alkaline phosphatase).

NOTES: Results are expressed as mean \pm SEM (n = 7) with $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ and $p < 0.001^{***}$ when compared to the heparin group.

3.2 CONTINUOUS USE OF HGGSL (CONTINUOUS USE ASSAY)

3.2.1 Blood count, biochemical analyses and acute phase proteins

Some anticoagulants, such as heparin, are also used for treatment of problems related to hypercoagulation. In a previous work, the antithrombotic effect and the possibility of using hGGSL subcutaneously were demonstrated. In addition, the anticoagulant effects of hGGSL could be suppressed by protamine, the antidote used to reverse the effects of an overdose of heparin (data not yet published – Article I). Thus, the promising results obtained with hGGSL motivated the investigation of the possible consequences of its continuous use, i.e., if hGGSL could cause adverse effects.

For the purpose described above, Wistar rats received either PBS or hGGSL subcutaneously for 14 days. After this period, blood samples were collected from the animals for blood count, biochemical analyses and for measurement of murine acute phase proteins (rat haptoglobin and rat C-reactive protein). In addition, the lungs, kidneys, spleen and liver of the animals were collected, weighed, and the liver histologically analyzed. The daily dose of hGGSL was 5 mg/kg, which increases about 3 times the normal aPTT value of Wistar rats, for at least 3 h (data not yet published – Article I). The weight of the animals at the beginning of the experiment was 187.80 ± 1.71 g and 195.5 ± 3.98 g and at the end was 240.80 ± 4.30 g and 238.80 ± 5.87 g (mean \pm SEM) in the PBS and hGGSL groups respectively, which was consistent with a normal development of the animals.

Considering all parameters analyzed, only RBC (red blood cell) count, RDW (red cell distribution width), triglycerides and glucose showed significant differences between the animals treated with PBS and hGGSL (Tables 3 and 4).

The slightly increased value of RDW in the hGGSL group could be indicates a discrete anisocytosis, which may be a consequence of an iron deficiency. In these cases, the RDW changes early, even before the variation of other parameters such as MCV (mean corpuscular volume) and the decrease of hemoglobin. Anisocytosis means that erythrocytes are heterogeneous in size, and it is generally caused by disturbances in the hemoglobinization phase of erythropoiesis [10, 11]. The

presence of an ionic compound such as hGGSL could chelate iron ions, this being perhaps the cause of the detected anisocytosis. However, the differences observed in RDW and also in RBC are very discrete and may represent only an intrinsic difference between the animals of both groups (PBS and hGGSL) and not necessarily a consequence of the continuous treatment with hGGSL. Therefore, this needs to be better evaluated in order to arrive at more precise conclusions.

TABLE 3 - COMPLETE BLOOD COUNT OF RATS SUBCUTANEOUSLY TREATED WITH PBS OR hGGSL FOR 14 DAYS.

Parameter	PBS	hGGSL
WBC (x 10 ³ /μL)	8.67 ± 0.58	10.16 ± 0.82
Lym (x 10 ³ /μL)	6.61 ± 0.56	8.19 ± 0.65
Mon (x 10 ² /μL)	1.86 ± 0.01	1.87 ± 0.02
Gran (x 10 ³ /μL)	1.87 ± 0.12	1.79 ± 0.18
RBC (x10 ⁶ /μL)	7.93 ± 0.15	8.49 ± 0.09**
Hemoglobin (g/dL)	13.17 ± 0.26	13.80 ± 0.18
HCT (%)	43.49 ± 0.79	45.49 ± 0.59
MCV (fL)	54.91 ± 0.49	53.68 ± 0.54
MCH (pg)	16.56 ± 0.12	16.21 ± 0.18
MCHC (g/dL)	30.21 ± 0.13	30.30 ± 0.17
RDW (%)	12.96 ± 0.18	13.58 ± 0.18*
Platelets (x 10 ³ /μL)	434.4 ± 14.45	472.9 ± 44.31
MPV (fL)	6.77 ± 0.96	7.05 ± 0.22
PDW (%)	15.86 ± 0.11	15.94 ± 0.10
PCT (%)	0.29 ± 0.009	0.32 ± 0.02

LEGEND: Wistar rats were treated with PBS (200 μl) or hGGSL (5 mg/kg) subcutaneously, once a day for 14 days. WBC (white blood cell), Lym (lymphocytes), Mon (monocytes), Gran (granulocytes), RBC (red blood cell), HCT (hematocrit level), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular haemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), RDW (red cell distribution width), MPV (mean platelet volume), PDW (platelet distribution width), PCT (plateletcrit).

NOTES: Results are expressed as mean ± SEM (n = 8) with $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$ when compared to the PBS group.

Regarding the biochemical parameters (Table 4), triglyceride and glucose values were significantly lower in hGGSL-treated animals. Contrary to an undesirable side effect, this result opens up an interesting perspective for the evaluation of hGGSL in diabetes models. In addition, hepatic (ALT, AST and AF) and renal function markers (creatinine and urea) do not suffer significant changes in animals treated with hGGSL. And, total, direct, and indirect bilirubin values also indicate that animals treated with hGGSL had no hemolytic, hepatic, or biliary problems.

TABLE 4 - BIOCHEMICAL ANALYSES OF RATS TREATED WITH PBS OR hGGSL SUBCUTANEOUSLY FOR 14 DAYS.

Parameter	PBS	hGGSL
Triglycerides(mg/dl)	50.21 ± 4.13	37.07 ± 2.32*
Total Cholesterol	57.75 ± 4.14	67.96 ± 3.16
HDL-C (mg/dl)	46.50 ± 3.54	54.41 ± 2.55
LDL-C (mg/dl)	3.62 ± 0.44	9.38 ± 2.20*
VLDL-C (mg/dl)	10.04 ± 0.82	7.41 ± 0.46*
ALT(U/l)	49.41 ± 2.51	44.10 ± 2.42
AST(U/l)	120.47 ± 6.77	129.59 ± 6.77
FA(U/l)	148.17 ± 10.24	123.25 ± 10.24
Glucose(mg/dl)	201.74 ± 12.37	153.81 ± 10.56*
Total Proteins(mg/dl)	6.32 ± 0.11	6.58 ± 0.05
Albumin(mg/dl)	2.91 ± 0.07	3.00 ± 0.05
Globulin(mg/dl)	3.41 ± 0.05	3.58 ± 0.06
Total bilirubin(mg/dl)	0.59 ± 0.07	0.61 ± 0.06
Direct bilirubin(mg/dl)	0.42 ± 0.05	0.50 ± 0.05
Indirect bilirubina (mg/dl)	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.01
Creatinine(mg/dl)	0.48 ± 0.02	0.62 ± 0.08
Urea (mg/dl)	47.6 ± 3.33	47.6 ± 1.65

LEGEND: Wistar rats were treated with PBS (200µl) or hGGSL (5 mg/kg) subcutaneously, once a day for 14 days.). HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol), LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol), VLDL-C (very low-density lipoprotein cholesterol), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), FA (alkaline phosphatase).

NOTES: Results are expressed as mean ± SEM (n = 8) with $p < 0.05^*$ when compared to the PBS group.

It is important to note that hGGSL did not induce an allergic or inflammatory process in the animals, which could be evidenced by the non-elevation of the WBC (white blood cell count; Table 3). However, since WBC elevation may take several days after the animal's contact with an inflammatory agent, the acute phase proteins haptoglobin and C-reactive protein were also evaluated. The animals treated with PBS and hGGSL did not present significant differences in the plasma levels of haptoglobin and C-reactive protein (Figure 1), which corroborates the results of WBC, that hGGSL does not induce allergic or inflammatory processes. In rats, haptoglobin is the better indicator of acute inflammation. Its plasma level increases after about 10 hours of the contact with some inflammatory agent, and remain elevated for up to 21 days [12].

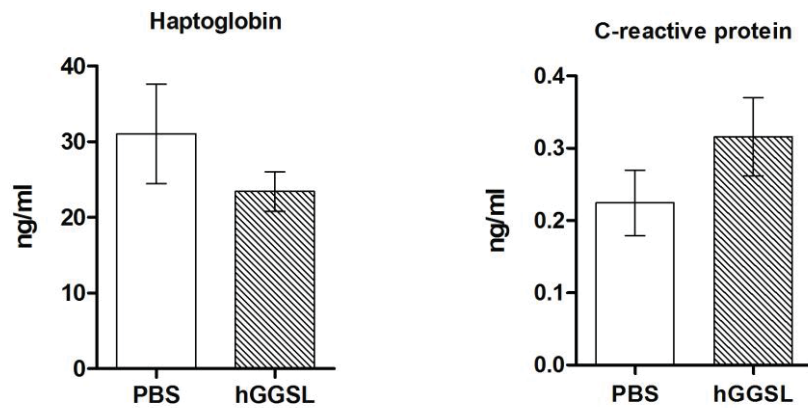


FIGURE 1 - PLASMA LEVEL OF ACUTE PHASE PROTEINS OF RATS TREATED WITH PBS OR HGGSL SUBCUTANEOUSLY FOR 14 DAYS
 NOTES: Wistar rats were treated with PBS (200 μ l) or hGGSL (5 mg/kg) subcutaneously, once a day for 14 days. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 8).

3.2.2 Organs analysis

Evaluation of organ weight can be used to investigate anomalies or dysfunctions. Cases of hepatomegaly may, for example, be related to an inflammatory process due to drug-induced hepatitis [13] As shown in figure 2, no significant differences were observed in the liver, kidneys, spleen and lungs weight among the animals treated with PBS or hGGSL.

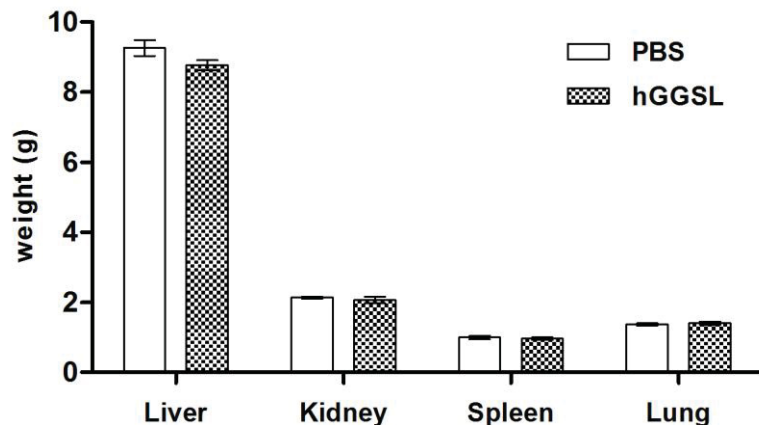


FIGURE 2 - WEIGHT OF ORGANS OF RATS TREATED WITH PBS OR HGGSL SUBCUTANEOUSLY FOR 14 DAYS
 NOTES: Wistar rats were treated with PBS (200 μ l) or hGGSL (5 mg/kg) subcutaneously, once a day for 14 days. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 8).

In addition to the macroscopic analysis, histopathological studies of the liver were also performed and confirmed the absence of tissue changes induced by the

continuous use of hGGSL. Cellular structures were intact, with no signs of necrosis, vacuolization or inflammatory infiltration. Representative microscopic images of the liver are shown in figure 3.

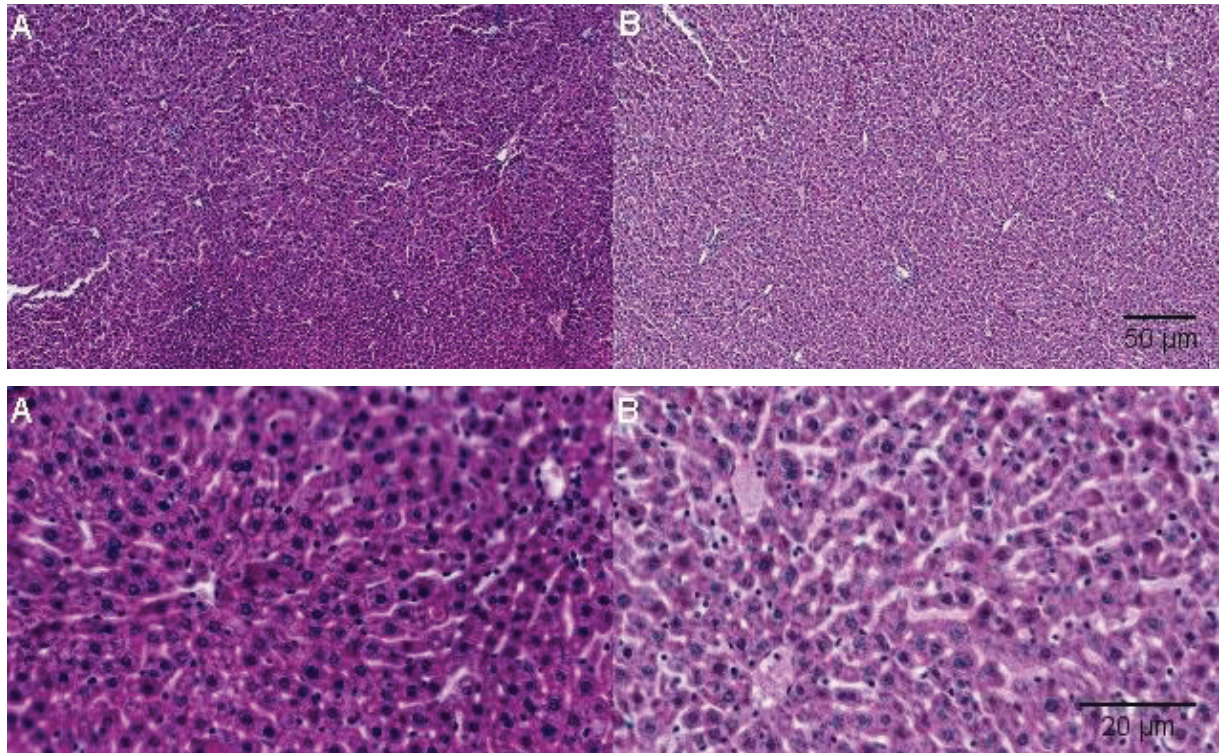


FIGURE 3 - REPRESENTATIVE HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE LIVER OF RATS TREATED WITH PBS OR HGGSL

NOTES: Wistar rats were treated subcutaneously, once a day for 14 days (n = 8), with PBS (A) (200 µl) and hGGSL (B) (5 mg/kg). Staining method: hematoxylin/eosin.

4. CONCLUSIONS

Considering the promising anticoagulant and antithrombotic results obtained with hGGSL in a previous work (Article 1), we now analyze the possibility of using this polysaccharide as an anticoagulant for *in vitro* use, as an anticoagulant for clinical laboratory, as well as the possibility of using it as an anticoagulant. In the latter case, it was investigated if the continuous use of hGGSL can cause side effects. The results showed that hGGSL is not suitable for use as an anticoagulant for clinical laboratory, since many biochemical and some hematological parameters showed to be modified in hGGSL anticoagulated samples. On the other hand, hGGSL seems to have potential as an anticoagulant for use, since it only slightly affected hematologic parameters, did not trigger inflammatory problems and organ

changes in animals, and appears to have led to beneficial changes in biochemical parameters. Interestingly, it reduced the levels of triglycerides and glucose in the animals, opening up a possibility of this sulfated polysaccharide being evaluated as an anti-diabetes compound with antithrombotic activity. Considering that the risk of thrombosis is increased in patients with diabetes, an anticoagulant agent that also manages to reduce blood glucose is quite interesting.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian agencies *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq – Grant number 449176/2014-2), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and *Financiadora de Estudos e Projetos* (FINEP) for financial support; *Hospital Veterinário da UFPR* for blood count and biochemical analysis; *Centro de Tecnologia Avançadas de Fluorescência UFPR*; and UFPR-RMN Center.

5. REFERENCES

- [1] J.C. Madeira; G.V.L. Silva; J.J. Batista; G.D. Saraiva; G.R.C. Santos; A.M.S. Assreuy; P.A.S. Mourão; M.G. Pereira. An arabinogalactan-glycoconjugate from *Genipa americana* leaves present anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. *Carbohydrate Polymers*, v. 202, p. 554-562, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.003>
- [2] Y. Roman, H.P.O. Barddal, M. Iacomini, G.L. Sasaki, T.R. Cipriani, Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin, *Carbohydr. Polym.* 174 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.110>.
- [3] H.P.O. Barddal, A.H. Gracher, F.F. Simas-Tosin, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.051>.
- [4] C. Araújo, M.D. Nosedá, T.R. Cipriani, A.G. Gonçalves, M.E. Duarte, D.R.B. Ducatti, Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 483-491. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.034>.
- [5] N.C. Maas, A H.P. Gracher, G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 1081-1087. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.070>.

- [6] T.R. Cipriani, A.H.P. Gracher, L.M. Souza, R.J.C. Fonseca, C. L. R. Belmiro, P.A.J. Gorin, G. L. Sasaki, M. Iacomini. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thromb. Haemost.*, 101 (2009), 860–896. <https://doi.org/10.1160/TH08-08-0556>
- [7] Gracher, A. H. P.; Cipriani, T. R.; Carbonero, E. R.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. *Thromb. Res.*, v. 126, p. 180-187, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.04.008>
- [8] J.C. Martinichen-Herrero, E.R. Carbonero, P.A.J. Gorin, M. IACOMINI. Anticoagulant and antithrombotic activity of sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. *Carbohydr Polym.* 60 (2005), 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.014>
- [9] M. Ezeja, A.O. Anaga, I.U. Asuzu. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *J. of Ethnopharmacol.* 51 (2014), 1155-1164. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.034>.
- [10] R. Henneberg, J.R.A. Correa, R.L. Koop, P.H. Silva. Ferrocínica e índices hematológicos no diagnóstico laboratorial da anemia ferropriva – revisão bibliográfica. *News Lab*, ed. 107, p. 134-144, 2011.
- [11] H.Z.W. Grotto. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. *Rev. Bras Hematol Hemoter.* 32, 2 (2010).
- [12] P.S. Giffen, J. Turton, C.M. Andrews, P. Barrett, C.J. Clarke, K.W. Fung, M.R., Munday, I.F. Roman, R. Smyth, K. Walshe, M.J. York. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch. of Toxicol.* 77, 7 (2003), 392-402. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0458-7>
- [13] L.F. Galuppo, F.A.R. Lívero, G.G. Martins, C.C. Cardoso, O.C. Beltrame, L.M.B. Klassen, A.V.S. Canuto, A. Echevarria, J.E.Q. Telles, G. Klassen, A. Acco. A mesoionic compound with antitumoral and haematological effects *in vivo*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (2016), 41-50. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12545>

5. CONCLUSÕES GERAIS

hGGSL, um polissacarídeo quimicamente sulfatado com peso molecular de 10,2 kDa e DS de 1,91, obtido a partir da hidrólise ácida parcial e sulfatação química da goma guar, apresentou excelente atividade anticoagulante *in vitro*, a qual pode ser inibida pela protamina. O efeito anticoagulante de hGGSL é dependente de serpina e está principalmente relacionado à inibição da trombina (FIIa) via antitrombina (AT). Além disso, hGGSL foi capaz de reduzir a trombose venosa e mostrou melhor biodisponibilidade do que o clexane quando administrado por via subcutânea.

Considerando os promissores resultados anticoagulantes e antitrombóticos obtidos com hGGSL, também foi investigada a possibilidade de utilizar este composto como anticoagulante para uso *in vitro*, para viabilizar análises clínicas, bem como a possibilidade de utilizá-lo como anticoagulante *in vivo*. Neste último caso, foi investigado se o uso crônico de hGGSL (5 mg/kg, subcutaneamente, uma vez ao dia, por 14 dias) pode causar efeitos colaterais. Os resultados mostraram que hGGSL não é adequado como anticoagulante para ser empregado em laboratório clínico, uma vez que muitos parâmetros bioquímicos e hematológicos se mostraram alterados em amostras de sangue anticoaguladas com hGGSL. Por outro lado, hGGSL parece ter potencial como anticoagulante para uso *in vivo*, uma vez que afetou apenas levemente parâmetros hematológicos, não desencadeou problemas inflamatórios e alterações de órgãos em ratos, e parece ter levado a mudanças benéficas em alguns parâmetros bioquímicos. Curiosamente, os animais tratados com hGGSL apresentaram menores níveis plasmáticos de triglicerídeos e glucose, abrindo a possibilidade deste polissacarídeo sulfatado ser avaliado como um composto antidiabetes. Considerando que o risco de trombose está aumentado em pacientes com diabetes, um agente anticoagulante que também consegue reduzir a glicemia é bastante interessante.

6. REFERÊNCIAS

AINLE, F. N.; PRESTON, R. J. S.; JENKINS, V. P.; NEL, H. J.; JOHNSON, J. A.; SMITH, O. P.; WHITE, B.; FALLON, P. G.; O'DONNELL, J. S. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. **Blood**, v. 114, n. 8, 1658-1665, 2009.

ALBAN, S.; FRANZ, G. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. *Biomacromolecules*. v. 2, n. 2, p. 354-361, 2001.

ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 267-276, 2002.

ARAÚJO, C. A., NOSEDA, M. D., CIPRIANI, T. R., GONÇALVES, A. G., DUARTE, M. E., DUCATTI, D. R.B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 483-491, 2013.

BARDDAL, A. H. GRACHER, F. F. SIMAS-TOSIN, M. IACOMINI, T.R. CIPRIANI, Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation, **International Journal Biological Macromolecules**, v. 80, p. 328-333, 2015.

BERNA-ERRO, A.; REDONDO, P.; LOPEZ, E.; ALBARRAN, L.; ROSADO, J. Molecular Interplay between Platelets and the Vascular Wall in Thrombosis and Hemostasis. **Current Vascular Pharmacology**. v. 11, n. 4, p. 409-430, 2013.

BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal**, v. 289, p. 313-330, 1993.

BOZZINI, C.E.; MOLINAS, F. Hemostasia. In: HOUSSAY A.B.; CIRGOLANI, H. E. **Fisiologia Humana de Houssay**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CAPILA, I.; LINHARDT, R.J. Heparin-protein interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 390-412, 2002.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. F. S. Study of blood coagulation cascade and the reference values. **Acta Veterinária Brasília**, v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.

CASU, B. Structure and active domains of heparin. In: Garg, H. G.; Linhardt, R. J.; Hales C. A. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Elsevier, 2005, p. 1-28.

CATERINA, R. D.; HUSTED, S.; WALLENTIN, L.; ANDREOTTI, F.; ARNESEN, H.; BACHMANN, F.; BAIGENT, C.; HUBER, K.; JESPERSEN, J.; KRISTENSEN, S. D.; LIP, G.

Y. H.; MORAIS, J.; RASMUSSEN, L. H.; SIEGBAHN, A.; VERHEUGT, F. W. WEITZ, J. I. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulation (Section I): Position paper of the ESC working group on thrombosis - task force on anticoagulants in heart disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, p. 569-579, 2013.

CAUGHEY, G. H. Building a better heparin. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 129-132, 2003.

CHANDARAJOTI, K; LIU, J.; PAWLINSKI, R. The design and synthesis of new synthetic low molecular weight heparins. **Journal of Thromboembolism and Haematology**, v.14, 6, p. 1135-1145. 2016.

CHATURBHUIJ, K. S.; SUMIT, G.; JITENDRA, B.; MAZUMDERB, S.; PRASAD, S. V.; ARUN, S. Mechanical and barrier properties of guar gum based nano-composite films. **Carbohydrate Polymers**. v.124, p. 77-84, 2015.

CHEN, Z.; SEIFFERT, D.; HAWES, B. Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1435-1439, 2014.

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 319, p. 154-165, 1999.

CLÉ, D. V.; GARCIA, A. A.; BRUNETTA, D. M.; SCHWARTZMANN, P. V.; MORIGUTI, J. C. Anticoagulação em pacientes hospitalizados. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 43, n. 2, p. 107-117, 2010.

CIPRIANI, T. R.; GRACHER, A. H. P., SOUZA, L. M., FONSECA, R. J. C; BELMIRO, C. L. R; GORIN, P. A. J; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis Haemostasis**, v. 101, p. 860–896, 2009.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **The Journal Experimental of Medicine**, v. 203, n.3, p. 493–495, 2006.

COMMON pathway of coagulation. Disponível em: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/pathway>>. Acesso em: 05/08/2019.

CURRY, A. N. G.; PIERCE, J. M. T. Conventional and near-patient tests of coagulation. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 7, n. 2, p. 45-50, 2007.

DAS, S.; SUBUDDHI, U. pH-Responsive guar gum hydrogels for controlled delivery of dexamethasone to the intestine, **International Journal Biological Macromolecules**, v. 79, p. 856-863, 2015.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**. v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.

EDELBERG, J. M., CHRISTIE, P.D., ROSENBERG, R.D. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. **Circulation Research**. v. 89, p. 117-124, 2001.

ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity, **Nature Reviews Immunology**. v. 13, p. 34-45, 2013.

EZEJA, M.; ANAGA, A.O.; ASUZU, I.U, Acute and sub-chronictoxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 151, p. 1155-1164, 2014.

EYRE, L.; GAMLIN, F. Haemostasis, blood plateletes and coagulation. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v. 11, n. 6, p. 244-246, 2010.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**. v. 34, p. 229-237, 2001.

FONSECA, R. J.; OLIVEIRA, S.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M.; MOURÃO, P. A. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and haemostasis-Stuttgart**. v. 99, n. 3, p. 539, 2008.

FRENCH, M. H.; FAXON, D. P. Current anticoagulation options in percutaneous intervention: designing patient-specific strategies. **Reviews in cardiovascular medicine**. v. 3, n. 4, p. 176, 2002.

GALUPPO, L.F.; LÍVERO, F.A.R.; MARTINS, G.G.; CARDOSO, C.C.; BELTRAME, O.C.; KLASSEN, L.M.B.; CANUTO, A.V.S.; ECHEVARRIA, A.; TELLES, J.E.Q.; KLASSEN, J.E.Q.; ACCO, A. A mesoionic compound with antitumoral and haematological effects in vivo. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.119, p. 41-50, 2016.

GRACHER, A. H. P. **Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidiomicetos**. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GRACHER, A. H. P.; CIPRIANI, T. R.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**. v. 126, p. 180-187, 2010.

GIFFEN, P.S; TURTON, J.; ANDREWS, C.M.; BARRETT, P.; CLARKE, C.J.; FUNG, K.W.; MUNDAY, M.R.; ROMAN, I.F.; SMYTH, R.; WALSH, K.; YORK, M.J. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. **Archives of Toxicology**, v. 77, ed. 7, p. 392-402, 2003.

GUPTA, S.; SAURABH, C.K.; VARIYAR, P.S.; SHARMA, A. Comparative analysis of dietary fiber activities of enzymatic and gamma depolymerized guar gum, **Food Hydrocolloids**. v. 48, p. 159-154, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL J.E. Tratado de Fisiologia Médica. In: _____. **Hemostasia e Coagulação Sanguínea**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. P. 457-468.

GROTTO, H.Z.W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**. v. 32, ed. 2, 2010.

HARTER, K.; LEVINE, M.; HENDERSON, S.O. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 16, 1, p. 11-17, 2015.

HEIT, J. A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 28. p. 370-377, 2008.

HEIT, J.A. Epidemiology of venous thromboembolism. **Nature Reviews: Cardiology**. v. 12, p. 464-474, 2015.

HENNEBERG, R.; CORREA, J.R.A.; KOOP, R.L.; SILVA, P.H. Ferrocínética e índices hematológicos no diagnóstico laboratorial da anemia ferropriva – revisão bibliográfica. **News Lab**. ed. 107, p. 134-144, 2011.

HINSBERGH, V. W. M. The endothelium: vascular controlo f haemostasis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95, p. 198-201, 2001.

HIRSH, J.; LEVINE, M.N. Low-molecular-weight heparin, **Blood**. v. 79, p. 1-18, 1992.

HIRSH, J.; ANAND, S.S.; HALPERIN, J.L.; FUSTER, V. Guide to anticoagulant therapy, Heparin: a statement for healthcare professional from the American Heart Association. **Circulation**, v. 103, p. 2994-3018, 2001.

HIRSH, J.; FUSTER, V.; ANSELL, J.; HALPERIN, J.L. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy, **Circulation**, v. 107, p. 1692-1711, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. R. A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and haemostasis-Stuttgart**, v. 85, n. 6, p. 958-965, 2001.

JAY, R. M.; LIU, P. L. How anticoagulants work. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 30, p. 30-39, 2006.

JIANG, C.; XIONG, Q.; LI, S.; ZHAO, X.; ZENG, X. Structural characterization, sulfation and antitumor activity of a polysaccharide fraction from *Cyclina sinensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 200-206, 2015.

JINDAL, M.; RANA, V.; KUMAR, V.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; TIWARY, A. K. Sulfation of *Aegle marmelos* gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1660-1668, 2013.

KU, S.K.; BAE, J.S. Antithrombotic activities of wogonin and wogonoside via inhibiting platelet aggregation. **Fitoterapia**, v. 98, p. 27-35, 2014.

LARM, O.; LARSSON, K.; SCHOLANDER, E. The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydrate Research**, v. 73, p. 332-336, 1979.

LINDAHL, U.; BÄCKSTRÖM, G.; HÖÖK, M.; THUNBERG, L.; FRANSSON, L. A.; LINKER, A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 7, p. 3198-3202, 1979.

LIU, H.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. Lessons learned from the contamination of heparin. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 313-321, 2009.

LOZANO, F. Actualización en trombosis venosa profunda que afecta a las extremidades inferiores: diagnóstico. **Angiología**, v. 55, p. 476-87, 2003.

LU, X.; MO, X.; GUO, H.; ZHANG, Y. Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1189-1195, 2012.

MAAS, N. C.; GRACHER, A. H. P.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1081-1087, 2012.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, p. 914-918, 2008.

MADEIRA, J.C.; Silva, G.V.L.; Batista, J.J; Saraiva, G.D.; SANTOS, G.R.C; ASSREUY, A.M.S.; MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.G. An arabinogalactan-glycoconjugate from *Genipa americana* leaves present anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 554-562, 2018.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Coagulação sanguínea e anticoagulants, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. In: GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1321-1341.

MANUAL de coleta de amostras e exames em patologia clínica e anatomopatologia do CDMA (Centro de Diagnóstico e Monitoramento Animal). Disponível em: https://www.cdmalaboratorio.com.br/Manual-colheita-patologia-clinica_anatomopatologia-CDMA.pdf. Acesso em: 07/02/19.

MARTINICHEN, J. C. **Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados**. 18 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2005.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 7-13, 2005.
MELO, R. E. V. A.; SILVA, C. O.; SILVA, L. O.; MELO, M. M. V. A.; LINS, E. M. Trombose Venosa Profunda. **International Journal of Dentistry**, v. 1, n. 2, p. 73-79, 2005.

MELLO, N.A.; DUQUE, F.L.V. Trombogênese e Trombofilia. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, p. 105-18, 2003.

MENAJOVSKY, L. B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. **The American journal of medicine**. v. 118, n. 8A, p. 215-305, 2005.

MESTECKINA, N. M.; EGOROV, A.V.; SHCERBUKHIN, V. D. Synthesis of Galactomannan Sulfates. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v. 42, n. 3, p. 368-373, 2006.

MESTECKINA, N. M.; SHCERBUKHIN, V. D. Sulfated Polysaccharides and their Anticoagulant Activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 267-273, 2010.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides. I.Pullulan sulfation. **European Polymer Journal**. v. 37, p. 541-546, 2001.

MIRHOSSEINI, H., AMID, B.T. review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. **Food Research International**, v. 46, p. 387-398, 2012.

MOUSA, S.A.; Heparin, low molecular weight heparin, and derivatives in thrombosis, angiogenesis, and inflammation: emerging links, **Seminars in Thrombosis Hemostasis** v. 33, 524-533, 2007.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal Biotechnology**, v. 77, p. 123- 135, 2000.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWEL, V. W. Hemostasia e Trombose. Harper Bioquímica Ilustrada, p. 559-568, 2007.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Biochemical Journal**, v. 86, p. 1323-1329, 1979.

NAGUMO, T.; NISHINO, T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides in Medicinal Applications**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 545-574.

NOGUEIRA, A. V. **Comparação das atividades anticoagulante e antitrombótica de heparinas bovina e suína de diferentes massas moleculares**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências –Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NOTI, C.; SEEBERGER, P.H. Chemical approaches to define the structure-activity relationship of heparin-like glycosaminoglycans. **Chemistry & Biology**, v.12, p. 731-756, 2005.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminaran. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

PERRINAUD, A.; JACOBI, D.; MACHET, M. C.; GRODET, C.; GRUEL, Y.; MACHET, L. Bullous hemorrhagic dermatosis occurring at sites distant from subcutaneous injections of heparin: Three cases. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 2, p. 5-7, 2006.

PETITOU, M.; CASU, B.; LINDAHL, U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. **Biochimie**, v. 85, p. 83-89, 2003.

POMIN, V.H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, p. 601-609, 2009.

PRABAHARAN, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 117-124, 2011.

PRAJAPATI, V.P.; JANIA, G.K.; MORADIYAA, N. G; RANDERIAA, N. P.; NAGARB, B. J.; NAIKWADIA, N. N.; VARIYAC, B. C. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 83-92, 2013.

RABENSTEIN, D. L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. **Natural product reports**. v. 19, n. 3, p. 312-331, 2002.

RANA, R.; RAIA, P.; TIWARY, A.K.; SINGH, R.S.; KENNEDY, J.F.; KNILL, C.J. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1031-1047, 2011.

RAND, M. L.; MURRAY, R. K. Hemostasia e Trombose. In: MURRAY, R. K.; GRANNEER, D. K.; RODWELL, V. W. **Bioquímica Ilustrada**. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. p. 559-567.

ROMAN, Y.; BARDDAL, H.P.O.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.; CIPRIANI, T.R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 731-739, 2017.

ROMAN, Y.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.; CIPRIANI, T.R. Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345-352, 2016.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SANDFORD, P.A.; BAIRD, J. Industrial utilisation of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. p. 412-485.

SCHINDELWOLF, M.; LINDHOFF-LAST, E.; LUDWIG, R. J.; BOEHNCKE, W.-H. Heparin induced skin lesions. **The Lancet**. v. 380, n. 9856, p. 1867-1879, 2012.

SHYALE, S.; CHOWDARY, K. P. R.; KRISHNAIAH, Y. S. R.; BHAT, N. K. (2006). Pharmacokinetic evaluation and studies on the clinical efficacy of guar gum-based oral drug delivery systems of albendazole and albendazole- β -cyclodextrin for colon-targeting in human volunteers. **Drug Development Research**, v. 67, p. 154-165, 2006.

SMITH, J. W.; DAY, T. K.; MACKIN, A. Diagnosing bleeding disorders. **Compendium**, v. 2, p. 828-843. 2005.

SORIGUE, M.; NIETO, J.; SANTOS-GOMEZ, M.; ARRATE, E.; JIMÉNEZ, M.J.; MORALES-INDIANO, C.; LOPEZ-VIAPLANA, L.; ORNA, E.; NAVARRO, J.T.; RIBERA, J.M.; XICOY, B. Indications and use of, and incidence of major bleeding with, antithrombotic agents in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 73, p. 24-28, 2018.

SUMIT, G.; CHATURBHUIJ, K. S.; PRASAD, S. V.; ARUN, S. Comparative analysis of dietary fiber activities of enzymatic and gamma depolymerized guar gum. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 149-154, 2015.

SUBHRASEEMA, D.; USHARANI, S. pH-Responsive guar gum hydrogels for controlled delivery of dexamethasone to the intestine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 856-863, 2015.

TAKANO, R.; NAGAI, T.; WU, X.; XU, X. Y.; HUY, N.T.; KAMEI, K.; HARA, S. Sulfation of polysaccharides using monomethyl sulfate. **Journal Carbohydrate Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1185-1190, 2000.

TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury, **Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 454-460, 2007.

UMASUTHAN, N.; WHANG, I.; LEE, Y.; LEE, S.; KIM, Y.; KIM, H.; JUNG, S.J.; OH, M.J.; CHOI, C. Y.; YEO, S.Y. Heparin cofactor II (RbHCII) from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular characterization, cloning and expression analysis. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 1, p. 194-208, 2011.

VASCONCELOS, A. F. D. **β -glucanas de isolados fúngicos do gênero botryosphaeria: produção, caracterização química e atividade anticoagulante**. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Campus Rio Claro, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2009.

VEIGA, A. G. M.; SANTOS, I. A. T.; PASSERI, C. R.; PAPINI, S. J. Venous thromboembolism. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 70, n. 10, p. 335-341, 2013.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, p. 1-7, 2009.

VISKOV, C.; ELLI, E.; URSO, E.; GAUDESI, D.; MOURIER, P. HERMAN, F.; BOUDIER, C.; CASU, B.; TORRI, G.; GUERRINI, M. Heparin dodecasaccharide containing two antithrombin-binding pentasaccharides: Structural features and biological properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 36, p. 25895-25907, 2013.

VOGEL, G. M. T.; MEULEMAN, D. G.; BOURGONDIËN, F. G. M.; HOBBELEN, P. M. J. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. **Thrombosis Research**, v. 54, p. 399-410, 1989.

VOGLER, E. A.; SIEDLECKI, C. A. Contact activation of blood-plasma coagulation. **Biomaterials**, v. 30, p. 1857-1869, 2009.

ZHANG, F.; YANG, B.; LY, M. SOLAKYILDIRIM, K.; XIAO, Z.; WANG, Z.; BEAUDET, J. M.; TORELLI, A. Y.; DORDICK, J. S.; LINHARDT, R. J. Structural characterization of heparins from different commercial sources. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 2793-2803, 2011.

WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the discovery of heparin and warfarin. **British Journal of Haematology**, v. 141, p. 757-763, 2008.

WEITZ, J.I. Low-molecular-weight heparins, **New England Journal of Medicine**. v. 337, p. 688-698, 1997.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

WOLBERG, A. S.; ROSENDAAL, F. R.; WEITZ, J. I.; JAFFER, I. H.; AGNELLI, G.; BAGLIN, T.; MACKMAN, N. Venous thrombosis. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 1, n. p. 15006, 2015.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963 (a).

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963 (b).

WU, S. J.; CHUN, M. W.; SHIN, K. H.; TOIDA, T.; PARK, Y.; LINHARDT, R. J.; KIM, Y. S. Chemical sulfonation and anticoagulant activity of a chondroitin sulfate. **Thrombosis Research**, v. 92, p. 273-281, 1998.

YOON, S. J.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; MOURÃO, P. A. S. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria chorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2326-2330, 2007.

YOSHIDA, T.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; URYU, T. Anti-AIDS virus activity in vitro of dextran sulfates obtained by sulfation of synthetic and natural dextrans. **Polymer Journal**, v. 25, 1069-1077, 1993.

YUFENG, W.; SHAO, J.; YAO, S.; ZHANG, S.; YAN, J.; WANG, H.; CHEN, Y. Study on the antitrombotic activity of Umbilicaria sculenta polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 231-236, 2014.

ANEXO 1 – CEUA 1038



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1038

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.166172/2016-42

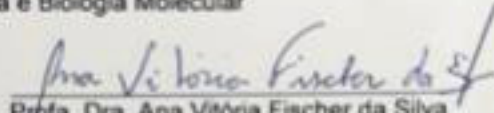
APROVADO/APPROVAL: 06/12/2016 – R.O. 11/2016

TÍTULO: Avaliação das atividades anticoagulante e antitrombótica das gomas comerciais guar e karaya, após sulfatação química

TITLE: Evaluation of the anticoagulant and antithrombotic activities of guar and Karaya commercial gums, after chemical sulfation

AUTORES/AUTHORS: Thales Ricardo Cipriani, Helyn Priscila de Oliveira Barddal

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Bioquímica e Biologia Molecular


Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA

ANEXO 2 - CEUA 1137



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1137

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.219330/2017-55

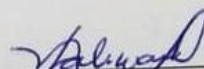
APROVADO/APPROVAL: 27/02/2018 – R.O. 01/2018

TÍTULO: Avaliação das atividades anticoagulante e antitrombótica das gomas comerciais guar e karaya, após sulfatação química.

TITLE: Evaluation of anticoagulant and antithrombotic activities of the commercial gums guar and karaya, after chemical sulfation.

AUTORES/AUTHORS: Thales Ricardo Cipriani, Helyn Priscila de Oliveira Barddal.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Bioquímica e Biologia Molecular



Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA