

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
**ROBERTO PEREIRA SANTOS**

EFEITOS ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DE UM DERIVADO DE  
HEPARINA INTESTINAL BOVINA

RIO DE JANEIRO  
2023

EFEITOS ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DE UM DERIVADO DE  
HEPARINA INTESTINAL BOVINA

Volumes: 1

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor (PhD) em Clínica Médica.

Orientadores: Paulo Antônio de Souza Mourão e Ana Maria Freire Tovar

Rio de Janeiro  
2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

P642e      Pereira Santos, Roberto  
             EFEITOS ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DE UM  
             DERIVADO DE HEPARINA INTESTINAL BOVINA / Roberto  
             Pereira Santos. -- Rio de Janeiro, 2023.  
             64 f.

             Orientador: Paulo Antonio de Souza Mourão.  
             Coorientador: Ana Maria Freire Tovar.  
             Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
             de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós  
             Graduação em Clínica Médica, 2023.

             1. Heparina. 2. Câncer. 3. Antitumoral. 4.  
             Antimetastática. 5. Metástase. I. de Souza Mourão,  
             Paulo Antonio, orient. II. Freire Tovar, Ana Maria,  
             coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto Pereira Santos

### EFEITOS ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DE DERIVADO DE HEPARINA INTESTINAL BOVINA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor (PhD) em Clínica Médica.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Paulo Antônio de Souza Mourão, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Ana Lucia Zuma de Rosso, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Rita de Cássia Leite Fernandes, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Soniza Vieira Alves Leon, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro e  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Nathalie Henriques Silva Canedo, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à minha mãe Eliane, que sempre me amou e apoiou.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço aos meus orientadores Ana Tovar e Paulo Mourão, por quem nutro grande carinho e profunda admiração, que me guiaram e me incentivaram nesta jornada.**



## RESUMO

**Introdução:** Em um cenário de aumento da expectativa de vida e do envelhecimento populacional, aliado a outros caracteres, como exposição a fatores carcinogênicos externos, intensifica-se o impacto populacional de neoplasias. É também necessária a busca por aprimoradas opções de tratamento, com eficácia e tolerabilidade, como a exploração de novas moléculas. Nesse sentido, a heparina tem sido investigada por apresentar efeitos biológicos além da anticoagulação, como ação antimetastática e antitumoral. Entretanto, a exploração clínica de seus potenciais benefícios é limitada pelo elevado risco hemorrágico. Este empecilho é contornado pelo desenvolvimento de um método de fracionamento de heparina intestinal bovina que segrega uma fração de heparina com baixa atividade anticoagulante (LABH), de maneira reproduzível e escalável. **Objetivo:** Neste trabalho essa fração é investigada a partir de ensaios pré-clínicos quanto às suas características farmacocinéticas, seu perfil de segurança e seu potencial antitumoral e antimetastático. **Metodologia:** Para isso, testamos a LABH em camundongos C57Bl/6, empregando modelos de sangramento, crescimento tumoral com células LLC (*Lung Lewis Carcinoma*, Carcinoma Pulmonar de Lewis) e de metástase induzida com células LLC e B16F10 (melanoma murinho). Foram testados esquemas de dose única, doses diárias e diferentes doses. **Resultados:** Os resultados demonstram que tal fração é absorvida pela via subcutânea, possui segurança quanto a para-efeitos hemorrágicos e apresenta efeito antitumoral em células LLC com maior efeito em duas semanas ( $p < 0.05$ ). Além disso, os dados sugerem redução da letalidade, redução da perda ponderal associada a neoplasia, bem como menor tamanho e pesos pulmonares. Apresentou também atividade antimetastática em células LLC e B16F10 em metástases macroscópicas ( $p < 0,05$ ) e microscópicas ( $p < 0.05$ ) de maneira dose-dependente em modelo murino. Os dados apontam que a LABH se relaciona a focos de metástases em menor número e menor tamanho, com diminuição da área pulmonar acometida. Há evidências de que esse efeito da LABH pode ser independente da P-selectina. **Conclusão:** Estes dados incentivam a continuidade da exploração da potencial aplicação dessa molécula, incluindo novos regimes de administração e outros modelos, com vistas ao incremento do arsenal onco-terapêutico.

**Palavras-chave:** heparina, antitumoral, antimetastático



## ABSTRACT

**Intruduction:** In a scenario of increasing life expectancy and population aging, combined with other factors, such as exposure to external carcinogenic agents, the populational impact of neoplasms is intensified. The search for improved treatment options, with efficacy and tolerability, such as the exploration of new molecules, has shown increased importance. In this perspective, it has been investigated heparin's biological effects other than anticoagulation, such as anti-metastatic and antitumoral activity. However, the clinical exploration of its potential benefits is limited by its high bleeding risk. This obstacle is overcome by the development of a method of fractionation of bovine intestinal heparin that provides a fraction of it with low anticoagulant activity (LABH), in a reproducible and scalable process. **Objectives:** In this work, this fraction of heparin is investigated on pre-clinical trials regarding its pharmacokinetic characteristics, its safety profile and its antitumor and anti-metastatic activity. **Methodology:** For this, we have tested LABH with C57BL/6 mice, using animal models of bleeding, tumor growth with LLC cells (Lung Lewis Carcinoma) and induced metastasis with LLC and B16F10 cells (murine melanoma). Single-dose, daily-dose, and different-dose schedules have been tested. **Results:** The results demonstrate that LABH is absorbed subcutaneously, it has safe profile concerning hemorrhagic side effects and has an antitumor activity on LLC cells with a greater effect in two weeks ( $p < 0.05$ ). In addition, these data suggest a reduction in lethality, a reduction in weight loss associated with neoplasia, as well as smaller lung size and weights. It has also showed antimetastatic activity against LLC and B16F10 cells on antimetastatic models, both in macroscopic ( $p < 0.05$ ) and microscopic ( $p < 0.05$ ) foci in a dose-dependent manner. These data also point to a lower number of metastases and smaller foci, with a decrease in the lung affected area. There are evidences that this LABH effect may be independent of P-selectin. **Results:** These results encourage further exploration of the potential application of this molecule, including new administration strategies and other experimental models, aiming the increasing of the onco-therapeutic arsenal.

**Key words:** Heparin, antimetastatic, antitumor.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação esquemática de unidades dissacarídicas das cadeias de heparina.
- Figura 2. Representação esquemática da estrutura da enoxaparina.
- Figura 3. Representação esquemática da composição das cadeias de heparina.
- Figura 4. Perfil de eluição de HNF suína, bovina em cromatografia de filtração em gel.
- Figura 5. Protocolos distintos de separação de HNF bovina por cromatografia de troca iônica.
- Figura 6. Potencial anticoagulante de frações da HNF bovina.
- Figura 7. Atividades anti-fator IIa, anti-fator Xa de LABH, HNF suína e enoxaparina.
- Figura 8. Perfis farmacocinéticos de enoxaparina, HNF suína e LABH
- Figura 9. Comparação de perfis normalizados da concentração plasmática de HNF suína dosada por atividade anti-FXa e anti-FIIa.
- Figura 10. Avaliação de sangramento dos três tipos de heparinas.
- Figura 11. Ensaio de crescimento tumoral com células LLC. Sobrevida relativa e variação ponderal corporal.
- Figura 12. Porcentagem de tumores complicados com células LLC.
- Figura 13. Ensaio de crescimento tumoral com células LLC.
- Figura 14. Imagem ilustrativa de fotografias representativas de pulmões com metástases de LLC.
- Figura 15. Imagens ilustrativas de microscopia óptica de lâminas de pulmão murino coradas com Hematoxilina & Eosina evidenciando focos metastáticos
- Figura 16. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Número de focos macroscópicos e microscópicos de metástase pulmonar.
- Figura 17. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Correlação entre o número de focos macroscópicos com o número de focos microscópicos.
- Figura 18. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Percentual de área pulmonar acometida por metástases à microscopia e correlação entre área pulmonar acometida e focos metastáticos à microscopia.
- Figura 19. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Número de focos tumorais à macroscopia e à microscopia.
- Figura 20. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Número de focos metastáticos à macroscopia e número de focos metastáticos à microscopia.
- Figura 21. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Número relativo de focos metastáticos à macroscopia ou microscopia.
- Figura 22. Imagens macroscópicas ilustrativas de metástases de melanoma.
- Figura 23. Número relativo de focos metastáticos de melanoma B16F10

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Parâmetros farmacocinéticos de LABH, HNF suína e enoxaparina

## LISTA DE ABREVIATURA

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*  
B16F10 – Células de Melanoma Murino  
bFGF – do inglês *Basic Fibroblast Growth Factor*, Fator de Crescimento de Fibroblasto básico  
CCS – Centro de Ciências da Saúde  
D – Dia  
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
EUA – Estados Unidos da América  
HABH – Heparina Bovina de Alta Atividade Anticoagulante  
HBPM – Heparina de Baixo Peso Molecular  
HMC – do inglês *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Principal de Histocompatibilidade  
HNF – Heparina Não Fracionada  
IP - Intraperitoneal  
IV – Intravenoso (a)  
LABH – *Low Anticoagulant Bovine Heparin*, Heparina Bovina de Baixa Atividade Anticoagulante  
LLC – do inglês *Lung Lewis Carcinoma*, Carcinoma Pulmonar de Lewis  
MC-38 – Células de Adenocarcinoma de Cólon Murino  
MC-38-GFP - Células de Adenocarcinoma de Cólon Murino Marcadas com *Green Fluorescent Protein* (GFP, Proteína de Fluorescência Verde)  
MO - Missouri  
mRNA – do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico Mensageiro  
N – Número Amostral  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RNA – do inglês *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico  
SC – Subcutâneo (a)  
SF – Soro Fisiológico (NaCl 0,9%)  
St - *Saint*  
TF – do inglês *Tissue Factor*, Fator Tecidual  
TFPI – do inglês *Tissue Factor Pathway Inhibitor*, Inibidor da Via do Fator Tissular  
TGF $\beta$ – do inglês *Transforming Growth Factor  $\beta$* , Fator de transformação do crescimento  $\beta$   
TTPa – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada  
UFH – do inglês *Unfractionated Heparin*, Heparina Não Fracionada  
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
VA - Virgínia  
VEGF – do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*, Fator de Crescimento Endotelial Vascular  
WT – do inglês *Wild Type*, Tipo Selvagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 HEPARINA: UMA MOLÉCULA CENTENÁRIA COM MÚLTIPLOS USOS .....	14
1.2 ESTRUTURA DA HEPARINA .....	15
1.3 HEPARINA NÃO FRACIONADA (HNF) E HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR (HBPM) .....	15
1.4 A HEPARINA INTESTINAL BOVINA POSSUI DOIS COMPONENTES COM AÇÃO ANTICOAGULANTE DISTINTA .....	16
1.5 FARMACOCINÉTICA .....	18
1.6 USO DE HEPARINAS EM NEOPLASIAS .....	19
1.6.1 <b>Inibição da interação e da ativação plaquetária induzida por células tumerais</b> .....	19
1.6.2 <b>Redução de células tumorais por inibição da expressão de proto- oncogenes</b> .....	20
1.6.3 <b>Inibição do rolamento e da adesão de agregado leuco-plaquetário- tumoral na parede endotelial, por meio de interação com selectinas</b> .....	21
1.6.4 <b>inibição de fatores de crescimento</b> .....	21
1.6.5 <b>inibição da transição epitélio-mesenquimal</b> .....	22
1.6.6 <b>inibição metastática por meio da inibição da heparanase</b> .....	22
1.7 PROPOSTA DE TRABALHO .....	23
1.8 OBJETIVOS .....	24
1.8.1 <b>Objetivo geral</b> .....	24
1.8.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	24
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	24
2.1 METODOLOGIA .....	24
2.1.1 <b>Heparinas</b> .....	24
2.1.2 <b>Animais</b> .....	25
2.1.3 <b>Cultura celular</b> .....	25
2.1.4 <b>Farmacocinética das heparinas após administração subcutânea</b> .....	25
2.1.5 <b>Avaliação do efeito hemorrágico das diferentes amostras de heparina</b> .....	26
2.1.6 <b>Modelo de crescimento tumoral de Carcinoma Pulmonar de Lewis (LLC)</b> .....	26

2.1.7 Modelos de metástase induzida .....	27
2.1.8 Análise histológica .....	28
2.1.9 Análise estatística.....	28
2.2 RESULTADOS.....	28
2.2.1 Fracionamento da LABH .....	28
2.2.2 Perfil anticoagulante <i>in vitro</i> da labh em comparação a HNF suína e enoxaparina.....	29
2.2.3 Absorção e farmacocinética .....	33
2.2.4 Efeito hemorrágico .....	35
2.2.5 Avaliação do efeito antitumoral das diferentes heparinas.....	37
2.2.6 Modelo de metástase induzida .....	41
2.2.6.1 modelo de metástase induzida com células LLC .....	42
2.2.6.1.1 ensaios com tratamento diário (DD) .....	44
2.2.6.1.2 ensaios com dose única (DU) .....	46
2.2.6.2 modelo de metástase induzida de células B16F10.....	50
3 CONCLUSÕES .....	52
4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	54
5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
6 REFERÊNCIAS .....	55

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HEPARINA: UMA MOLÉCULA CENTENÁRIA COM MÚLTIPLOS USOS

Há cerca de um século, Jay McLean (1916) relatou o efeito anticoagulante de um extrato de fígado canino. Nos anos seguintes o processo de extração foi aprimorado por William H. Howell e L. Emmett Holt Jr. no Hospital Johns Hopkins em 1918, que cunharam o termo heparina adicionando o sufixo *-in* (usado para denotar um tipo de composto ou substância bioquímica), para a palavra latina para o fígado, *hepar* (ONG, 2019). Nas décadas seguintes houve um expressivo aumento dos estudos sobre as características estruturais, mecanismo de ação e seu uso clínico iniciou de forma incipiente mais precisamente na década de 1930. As primeiras indicações de uso da heparina incluíram tratamento e profilaxia de trombose, seguido de tratamento de tromboembolismo. Na década de 1970 também era utilizada para profilaxia de tromboembolismo em dispositivos de circulação extracorpórea (HEMKER, 2016). Atualmente preparações farmacêuticas de heparina são purificadas de material biológico, principalmente o intestino suíno (ODUAH, 2016). Esse conjunto de resultados foi complementado pela descoberta da antitrombina e a demonstração de que essa proteína plasmática (uma serpina) é o principal alvo da ação anticoagulante da heparina (BRINKHOUS, 1939; WAUGH 1956; MONKHOUSE, 1955; ABILDGAARD, 1968; DAMUS, 1973; MATTSSON, 1989; ONISHI, 2016). A heparina potencializa o efeito inibidor da antitrombina sobre as proteases do sistema de coagulação, particularmente a trombina e o fator Xa.

A heparina possui vários outros efeitos além da ação anticoagulante. Atua também como inibidor de infecções virais, da proliferação celular, inibe o crescimento tumoral, etc (NIERS, 2007; ATALLAH, 2020; MA, 2020; TANG, 2020a, 2020b). Recentemente o uso clínico da heparina teve um grande impacto devido a pandemia de COVID-19. É sabido que tal infecção viral é capaz de induz a coagulação intravascular disseminada e a formação de microtrombos na microcirculação pulmonar em pacientes críticos. Este aspecto realça a relevância da susceptibilidade genética individual e seu impacto no espectro de manifestação da doença, como graus de gravidade distintos e lesão órgão-específica. De fato, o cenário pandêmico causado pelo SARS-CoV-2 levou ao amplo uso clínico da heparina nos pacientes com COVID-19 severa (GUPTA, 2019; IBA, 2019; NEGRI 2020; TANG, 2020a, 2020b). A

heparina voltou novamente a ser um medicamento com grande atenção de investigadores.

## 1.2 ESTRUTURA DA HEPARINA

A heparina é uma das moléculas da família dos glicosaminoglicanos. Trata-se de um polissacarídeo linear, composto por unidades alternadas de ácido idurônico 2-sulfatado ligado a glucosamina N,6-disulfatada (GlcNS,6S) (Figura 1A). Vários outros componentes minoritários são encontrados na molécula, alguns com expressiva importância biológica. Destacamos as unidades de glucosamina N,3,6-trisulfatadas e ácido glucurônico, componentes de uma sequência pentassacarídica da molécula responsável pela potencialização da ação da antitrombina (Figura 1B).

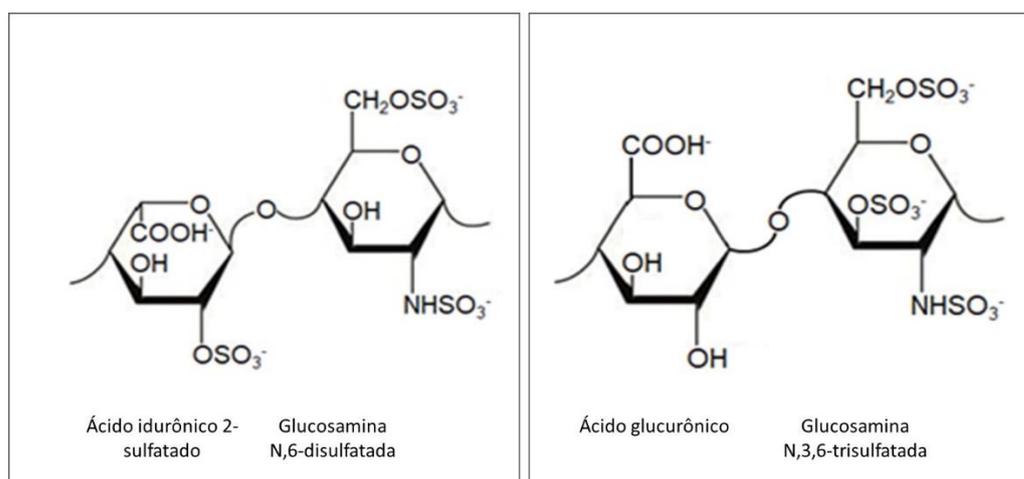


Figura 1. Representação esquemática de unidades dissacarídicas presentes nas cadeias de heparina.

## 1.3 HEPARINA NÃO FRACIONADA (HNF) E HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR (HBPM)

A preparação farmacêutica de heparina obtida pela extração de tecido animais é denominada de Heparina não Fracionada (HNF), com peso molecular (PM) entre 15-19 kDa. Essas preparações são utilizadas preponderantemente por via endovenosa e apresentam várias limitações (VERSTRAETE, 1990; KANDROTAS, 1992), como:

- Grande variabilidade na resposta individual;
- Janela terapêutica estreita;
- Necessidade de monitoramento constante com as medidas de TTPa para assegurar que o nível terapêutico seja alcançado;

- d) Utilizado preponderantemente por via intravascular o que não permite seu uso em pacientes ambulatoriais.

Esses efeitos indesejáveis da heparina foram superados com a introdução da Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM), com PM entre 3-8 kDa, obtidas por fragmentação controlada da HNF. As preparações de HBPM apresentam várias vantagens em comparação com a HNF (VERSTRAETE 1990; WOLF, 1994), como:

- Administração por via subcutânea (SC);
- Efeito mais previsível e sem necessidade de monitoramento;
- Efeitos adversos muito menos frequentes do que as HNF, especialmente ação reduzida no sangramento e menor incidência de trombocitopenia;
- Administração a pacientes ambulatoriais.

Diferentes tipos de HBPM estão disponíveis no mercado com denominações diversas, decorrente do método de fragmentação usado para sua preparação. A HBPM de maior uso é a enoxaparina obtida pela fragmentação da HNF pela  $\beta$ -eliminação química. A figura 2 mostra a estrutura da enoxaparina, mostrando as unidades terminais introduzidas na molécula durante a reação de  $\beta$ -eliminação.

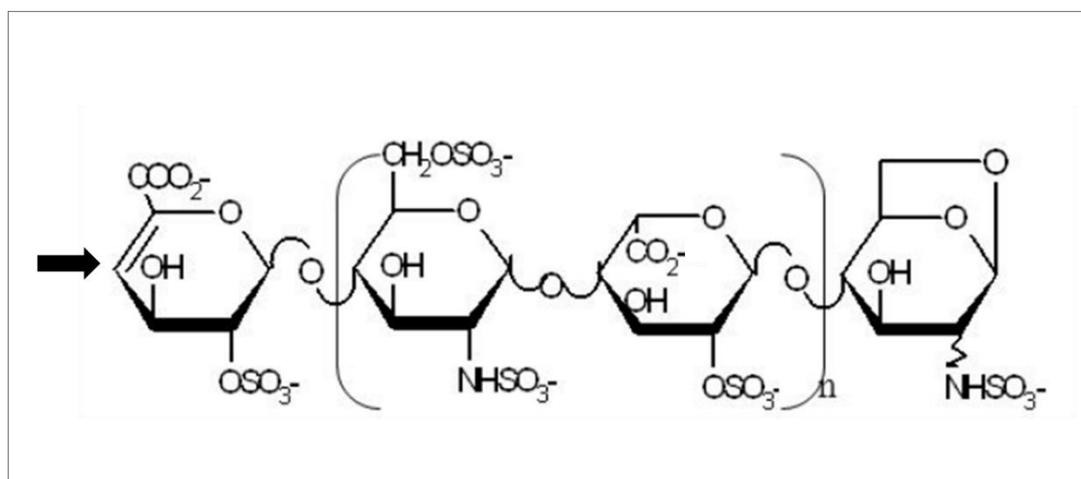


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da enoxaparina. Seta: dupla ligação formada no sítio de clivagem no ácido urônico.

#### 1.4A HEPARINA INTESTINAL BOVINA POSSUI DOIS COMPONENTES COM AÇÃO ANTICOAGULANTE DISTINTA

A heparina foi originalmente obtida a partir de fígado canino. Essa não era uma fonte factível para a preparação de heparina na escala necessária para seu uso

clínico, que atinge várias toneladas nos dias atuais. Logo ficou premente a necessidade de buscar fontes alternativas e o pulmão bovino foi o tecido escolhido (KANDROTAS, 1992). Na década de 60 a heparina obtida de intestino suíno passou a ser introduzida e constitui atualmente a fonte preponderante desse medicamento e a única utilizada para a produção de HBPM.

Outra fonte expressiva para a obtenção de heparina é o intestino bovino. Essa é a principal fonte de heparina em países com predomínio da religião muçulmana. No Brasil esses dois tipos de heparina estão disponíveis, mas como medicamentos distintos. A Farmacopeia Brasileira foi inovadora em introduzir monografias distintas para as heparinas suína e bovina (BRAZILIAN PHARMACOPOEIA, 2019). Esses dois tipos de heparina possuem diferenças expressivas nas suas unidades dissacarídicas e na ação anticoagulante.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que as preparações farmacêuticas de heparina bovina possuem dois componentes, que podem ser separados numa única etapa de cromatografia de troca iônica. Um dos componentes é denominado de Heparina Bovina de Alta Atividade Anticoagulante (HABH), com estrutura química e atividade anticoagulante semelhante a heparina suína. O outro componente, denominado como Heparina Bovina de Baixa Atividade Anticoagulante (LABH) tem baixa atividade anticoagulante e diferenças estruturais expressivas em comparação com a HABH, especialmente quantidades muito expressivas de unidades de glucosamina N-sulfatada, mas sem sulfatação da posição 6 (TOVAR, 2019). A Figura 3 mostra um esquema dessas duas frações.

LABH tem uma potencial aplicação como substituto da HNF e HBPM em situações não relacionadas com a anticoagulação e trombose. Nessas situações a alta atividade anticoagulante e conseqüente ação no sangramento é o principal limitante para o uso de heparina.

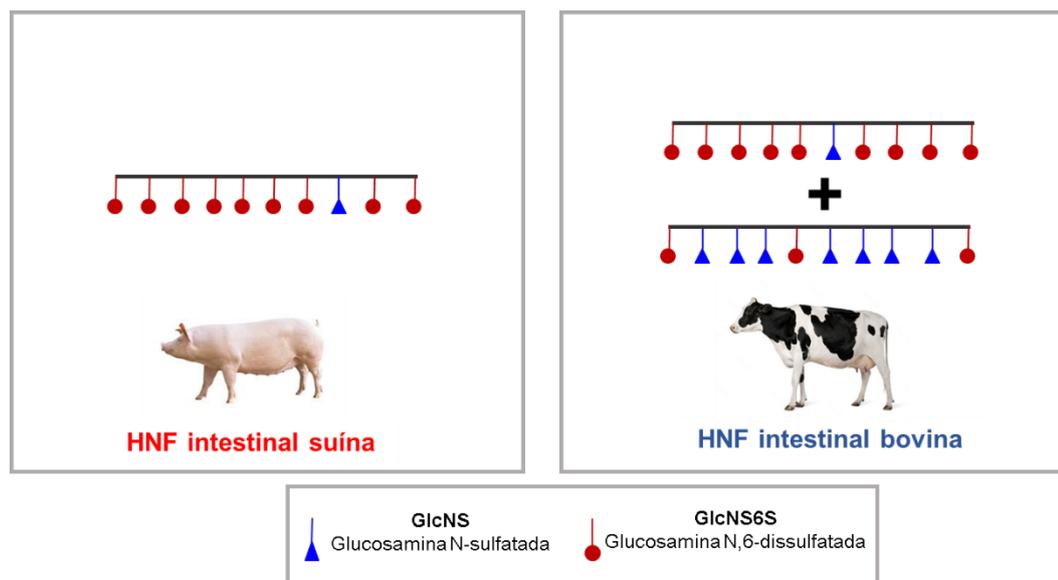


Figura 3. Representação esquemática da heterogeneidade da composição das cadeias de heparina. Glc = glucosamina, HNF = heparina não fracionada.

### 1.5 FARMACOCINÉTICA

No que se refere à prática clínica, as vias de administração da HNF suína são a intravenosa (IV) e a SC e, enquanto HBPM, como enoxaparina, são usadas preferencialmente por via SC. As formulações farmacêuticas da HNF suína possuem PM médio de 17 kDa (15-19 kDa) e sua biodisponibilidade varia em torno de 20-40% quando administradas por via SC, tendo como método de aferição a inibição da atividade do fator Xa (KANDROTAS, 1992). Sua via de eliminação parece contar com dois mecanismos distintos: um saturável, composto pela degradação endotelial, que atua em doses mais baixas, e um insaturável, capitaneado pela excreção renal, que atua em doses mais altas. Estes 2 mecanismos agindo simultaneamente descreveriam uma meia-vida entre 0,5 e 2,5h, variável em função da dose de administração. A nível celular, a HNF suína é endocitada pelo endotélio e despolimerizada em pequenos segmentos em um processo que conta com a atuação de glicosidases lisossomais e sofre, ainda, N-desacetilação e N-dessulfatação. A HBPM, por sua vez, apresenta peso molecular médio entre 3-8 kDa parece ser degradada apenas por um sistema não saturável, de modo que apresenta pico de atividade entre 3 e 5 h e tempo de meia-vida de 4,5 h não dose-dependente e que pode chegar ao dobro do tempo de meia-vida da HNF suína. Apresenta menor afinidade por adsorção às e degradação pelas células endoteliais, possivelmente em

função de seu menor peso molecular e/ou menor intensidade de cargas negativas. Sua principal forma de eliminação se configura pela excreção renal, isto é, o sistema insaturável. A eliminação tanto da HNF suína quanto da HBPM é significativamente reduzida em pacientes com doença renal avançada, podendo chegar ao dobro do tempo de meia-vida no caso da HBPM. Já em pacientes com insuficiência hepática parece haver algum prolongamento do tempo de meia-vida, sugerindo que o fígado pode desempenhar algum papel coadjuvante na eliminação desses fármacos.

## 1.6 USO DE HEPARINAS EM NEOPLASIAS

Sabe-se que pacientes portadores de neoplasias apresentam risco aumentado de eventos trombóticos quando comparados a pacientes não portadores dessa condição (HEIT, 2000). Evidências mostram que esse risco aumenta em função de fatores além da presença da neoplasia em si, como idade, eventos trombóticos prévios, quimioterapia, além de maior associação a determinados sítios primários, como neoplasia de pâncreas, rins, pulmões, cérebro, ovários e outros tumores abdominais (KHORANA, 2007). O uso de anticoagulantes nesses casos é tema ainda controverso. Algumas revisões sistemáticas e meta-análises evidenciam aumento de sobrevida a depender do tipo de neoplasia (LEE, 2005; LAZO-LANGNER, 2007; YU, 2016), enquanto outros trabalhos concluem ausência de benefício estatisticamente significativo (MACBETH, 2015; EK, 2018). Ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo*, ao contrário, são congruentes ao demonstrarem atividade antitumoral e/ou antimetastática da heparina. Diversos trabalhos propõem mecanismos, que podem fazer parte de uma (ou mais) complexa rede de eventos, cujo resultado final inclui a ação antineoplásica e a inibição de metástase pela heparina e compostos análogos.

### 1.6.1 Inibição da interação e da ativação plaquetária induzida por células tumorais

Ao entrar na corrente sanguínea a célula tumoral interage com plaquetas e passa a ser coberta por elas, o que configura uma proteção ao sistema imune. Essas plaquetas desempenham um papel importante na proteção das células tumorais. Por meio da secreção plaquetária de Transforming Growth Factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) há uma regulação negativa das células *natural killers* (NK) por meio da inibição do receptor NKG2D. Além disso, o complexo HMC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*,

Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe 1 das plaquetas é transferido para as células tumorais, que passam a expô-los nas superfícies, conferindo um fenótipo pseudonormal (KOPP, 2009; PLACKE, 2012).

As células tumorais são capazes de ativar plaquetas, resultando na exposição de diversas moléculas na superfície como P-selectina e integrina  $\alpha 6\beta 1$  e na secreção de mediadores solúveis como ADP e tromboxano A<sub>2</sub>. (AITOKALLIO-TALLBERG, 1988; ZUCHELLA, 1989; DOVIZIO 2013; MAMMADOVA-BACH, 2016). A interação das moléculas de superfície da célula tumoral com plaquetas e leucócitos confere, ainda, a formação de um agregado leuco-plaquetário ao redor da célula. Isto proporciona uma interface *self* entre a célula e as células NK, o que reduz as chances de sua eliminação (COUPLAND, 2012; SCHLESINGER, 2018). Ademais, as plaquetas e leucócitos desse êmbolo expressam moléculas de adesão que facilitam o rolamento e a parada da célula neoplásica na parede vascular para a posterior invasão do sítio metastático (SCHLESINGER, 2018).

A heparina reduz a formação de trombina e inibe o acoplamento das células tumorais com as plaquetas por meio de uma ligação competitiva com moléculas de adesão e inibe a formação de êmbolo metastático por meio da interação com P- e L-selectinas (BORSIG, 2004; LUDWIG, 2009; BORSIG, 2010A; SCHWARZ, 2020) e pela inibição da interação célula tumoral-plaqueta mediada pela integrina  $\alpha$ -IIb/ $\beta$ -III (ZHANG, 2004). Desta forma, as células tumorais estariam mais expostas à eliminação pelas células NK.

### **1.6.2 Redução de células tumorais por inibição da expressão de proto-oncogenes**

A expressão do proto-oncogene da ciclina D1 (C<sub>cmd</sub>1) tem papel na progressão das fases de G1 para a fase S da divisão celular. Está superexpresso em diversos tumores. A enoxaparina demonstrou ser capaz de reduzir a expressão desse proto-oncogene e de reduzir a viabilidade de células neoplásicas (DJAAFAR, 2016). Em trabalhos anteriores foi observado que a heparina foi capaz de bloquear a célula na fase G1 por meio da regulação negativa de RNA mensageiros (mRNA) de c-fos, c-jun, myb, and myc (CASTELLOT, 1985), além de bloquear as vias da proteína quinase C (PKC) (CASTELLOT, 1989; Pukac,1990) e proteína quinase mitogênica ativada (MAPK) (OTTLINGER, 1993; DAUM,1997; MISHRA-GORUR, 1999).

### **1.6.3 Inibição do rolamento e da adesão de agregado leuco-plaquetário-tumoral na parede endotelial, por meio de interação com selectinas**

Para realizar a diapedese, leucócitos expressam moléculas de adesão na sua superfície, que interagem com moléculas da superfície das células endoteliais. Esta interação provoca um fenômeno conhecido como rolamento, que reduz a velocidade do carreamento do leucócito pela corrente sanguínea e permite a interação de moléculas de adesão com maior potencial adesivo para, então, ocorrer a migração transendotelial. Um processo similar ocorre com os leucócitos que participam do agregado leuco-plaquetário-tumoral. Nesse processo, outro mecanismo de ação antimetastática das heparinas proposto é a inibição do rolamento e da adesão firme do agregado leuco-plaquetário-tumoral por meio da inibição de moléculas adesivas presente em plaquetas e em leucócitos, como selectinas (L- e P-selectinas) e integrinas (ex. e  $\beta$ 2-integrin) (DIAMOND, 1995; KOENIG, 1998; DA SILVA, 2003; BERECZKY, 2005). A heparina inibe distintas etapas da migração celular transepitelial: rolamento, ativação, adesão e transmigração (LEVER, 2012).

### **1.6.4 Inibição de fatores de crescimento**

A neoangiogênese é um processo importante para o crescimento tumoral. As células neoplásicas estão em intensa proliferação e apresentam alta demanda de suprimento vascular. Elas secretam fatores de crescimento como VEGF e bFGF que são capazes de interagir com glicosaminoglicanos da superfície endotelial e promover amplificação da rede vascular (SENGER, 1986; KUMAR, 1998).

Cadeias de heparinas são capazes de interagir com esses fatores e competitivamente inibir seu estímulo vascular (LEPRI, 1994; SOKER, 1994; COLIN, 1999). As cadeias de heparina, em especial as porções mais sulfatadas, se ligam ao TGF $\beta$ 1, inibindo a interação deste com seu receptor, desta forma, podem inibir angiogênese e o crescimento tumoral (LYON, 1997; YUANHONG, 2003; RIDER, 2017). A superexpressão de fator tissular (TF) presente em diversas células neoplásicas também se correlaciona com a angiogênese e a hipercoagulabilidade e desempenha papel importante no desenvolvimento tumoral. Essa via do fator tissular também é inibida pelo inibidor da via do fator tissular (TFPI), (CASTELLI, 2004; AHMAD, 2010). A expressão de TF é inibida de maneira FXa-dependente pelo TFPI.

O TFPI é sintetizado principalmente em e localizado nas células endoteliais vasculares e é capaz de inibir o crescimento de tumores metastáticos em camundongos. A heparina também é capaz de induzir a liberação de TFPI (NIERS, 2007; NEVO, 2019). O TFPI, especialmente TFPI-2 sintetizados por células vasculares, apresentam atividade antimetastática por meio da regulação negativa de elementos envolvidos na degradação da matriz extracelular durante o extravasamento ou intravasamento, como heparanase e metaloproteinase-1 de matriz (NEVO, 2019; LIU, 2021).

#### **1.6.5 Inibição da transição epitélio-mesenquimal**

As células mesenquimais possuem a habilidade de invadir e de migrar através da matriz extracelular. Isto se deve em parte à configuração de pontos de adesão evanescentes e de plasticidade do seu citoesqueleto (YANG, 2020). As plaquetas estão envolvidas na indução da transição epitélio-mesenquimal (TEM) das células tumorais, o que fomenta o processo metastático (PONERT, 2018). Elas interagem fisicamente com células tumorais no tumor primário, são ativadas e degranulam fatores de crescimento como TGF $\beta$ , fator de crescimento hepatocitário (HGF) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), que induzem o processo de TEM. Moléculas de adesão como P-selectina e GPIIb/IIIa medeiam a adesão de plaquetas nas células tumorais e ambas podem ser bloqueadas pela heparina (Fabricius, 2021).

#### **1.6.6 Inibição metastática por meio da inibição da heparanase**

A heparanase é uma enzima capaz de degradar moléculas de heparan sulfato, que estão presentes na forma de proteoglicanos na matriz extracelular. Essa enzima é superexpressa em diversos tipos tumorais e desempenha papel facilitador do processo metastático, uma vez que promove a degradação da matriz extracelular e da membrana basal do sítio do tumor primário e do sítio de implantação secundária. Assim, facilita o desprendimento da célula do tumor inicial e a invasão do sítio de implantação.

Tanto a HNF suína como outras heparinas, incluindo HBPM, inibem competitivamente a atividade da heparanase e isto ocorre mesmo em cadeias de heparina 6-O-dessulfatadas (VLODAVSKY, 2007; CASSINELLI, 2020). Além disso, enoxaparina demonstrou reduzir a quantidade de RNA mensageiro (mRNA) e a concentração de heparanase nas células tumorais (DJAAFAR, 2016).

Esses mecanismos inibitórios são observados em diversos modelos animais usando-se diferentes faixas de concentração de heparina e formulações heparinoides. Os tumores testados incluem câncer de mama, câncer de cólon, melanoma, osteossarcoma e carcinoma pulmonar (BORSIG, 2010b). Esses mecanismos são independentes da atividade anticoagulante da heparina (YOSHITOMI, 2004; KRAGH 2005; STEVENSON, 2005; HOSTETTLER, 2007).

## 1.7 PROPOSTA DE TRABALHO

Conforme demonstrado, acumulam-se trabalhos apontando efeitos biológicos diversos para o emprego de heparina, destacando-se o potencial antineoplásico. A principal limitação para o uso de heparinas como um medicamento antitumoral e antimetastático é que as doses necessárias para atingir esses efeitos terapêuticos são superiores às aquelas para induzir a anticoagulação. Em consequência, o principal efeito indesejável da heparina, o sangramento, impede o uso desse medicamento como antineoplásico.

Essa questão pode ser superada pelo uso do LABH, que possui efeito anticoagulante muito reduzido. Esta fração de heparina bovina pode apresentar efeitos biológicos similares aos já conhecidos da HNF, o que aliado à baixa atividade anticoagulante incentiva a pesquisa de um vindouro benefício clínico em contextos diversos. Ademais, cabe enfatizar que a LABH configura um novo produto, porém não é uma molécula nova, pois faz parte do conjunto de cadeias que compõem a HNF de intestino bovino, que já é aprovado como um medicamento anticoagulante.

Fundamentando-se na apresentação das vias de administração das diferentes formulações farmacêuticas de heparinas atualmente comercializadas, bem como no perfil farmacocinético, a via SC se torna a via de escolha em detrimento da via IV para um ulterior ensaio clínico com a LABH. Tal horizonte norteia os presentes ensaios pré-clínicos exploratórios, com o destaque que esta via oferece menor invasividade de dispositivos, maior facilidade posológica para o paciente e possibilidade de prescrição a nível ambulatorial.

Diante do exposto, com vistas a emular com maior verossimilhança o que doravante seria a via de administração farmacológica da LABH, primamos por modelos animais cuja via de administração desta e de outras heparinas seja a SC.

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 **Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é testar a LABH por via SC em modelos experimentais de crescimento tumoral e em modelos de metástase e comparar com enoxaparina e HNF suína.

### 1.8.2 **Objetivos específicos**

Os Objetivos específicos do trabalho são:

- a) Determinar se há absorção por via subcutânea e determinar a farmacocinética;
- b) Analisar potencial hemorrágico;
- c) Avaliar atividade antitumoral;
- d) Investigar atividade antimetastática.

## 2 DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o nº 034/20, A12/20-032-20, A26/21-A03-21-008-20, que é registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87.

### 2.1 METODOLOGIA

#### 2.1.1 **Heparinas**

A LABH empregada nos ensaios foi preparada fracionando um *pool* contendo 10 lotes de preparações farmacêuticas de HNF de intestino bovino disponíveis no mercado brasileiro por meio cromatografia de troca iônica, seguindo o “Protocolo 1” descrito em Tovar et al. (TOVAR, 2019). HNF suína (Hemofol) foi obtida da Cristália (Itapira, Brasil) e a HBPM - enoxaparina (Clexane) da Sanofi (Singapura). O sexto Padrão Internacional de Heparina (2.145 unidades por frasco, Lote nº 07/328) e o Terceiro Padrão Internacional para LMWH (Lote 11/176) foram obtidos do Instituto Nacional para Padrões e Controles Biológicos (NIBSC; Potters Bar, Reino Unido).

### 2.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos adultos C57Bl/6 *wild type* (WT) e *knockout* para P-selectina (P-selectina <sup>(-/-)</sup>) entre 8-12 semanas de vida, machos e fêmeas, cujas proles foram obtidas a partir do biotério do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ. Foi necessário número amostral (N) distinto entre os ensaios, o que será *a posteriori* pormenorizado. Mantiveram-se alojados em gaiolas comportando no máximo 5 indivíduos, com fornecimento de ar filtrado, de maravalha esterilizada e sem resíduos e de ração e água à livre demanda, mantidos à temperatura controlada de 22 – 24°C e iluminados artificialmente em ciclos de 12h. Foram seguidos os cuidados e manejos em observância às normas da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da UFRJ.

### 2.1.3 Cultura celular

Células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC; ATCC, Manassas, VA, EUA) e de melanoma (B16F10; ATCC, Manassas, VA, EUA) foram conservadas congeladas em nitrogênio líquido. A cada ensaio uma fração de células foi descongelada e cultivada em meio de Dulbecco-Eagle modificado (DMEM) (Vitrocell; Campinas, Brasil) acrescido de 10% de volume de soro fetal bovino (Invitrogen; Waltham, EUA), sem adição de antibióticos, mantidas em estufa com ambiente controlado e umidificado a uma temperatura 37° C. Os demais reagentes foram obtidos da Sigma (St Louis, MO, EUA). As células foram cultivadas até se alcançar confluência da cultura, em período de aproximadamente 7 dias. Antes da administração nos animais as células confluentes foram tratadas com tripsina e ressuspendidas em meio DMEM para contagem. A viabilidade celular se manteve acima de 85% evidenciada pela utilização de azul de tripam.

### 2.1.4 Farmacocinética das heparinas após administração subcutânea

As concentrações plasmáticas das heparinas foram indiretamente estimadas medindo a atividade residual anti-FXa ou anti-FIIa (GLAUSSER, 2011; OLIVEIRA, 2015; VILANOVA, 2016; SANTOS, 2022). Resumidamente, animais tratados por via SC com doses de 2, 8 e 20 mg/kg de enoxaparina, HNF suína e LABH, respectivamente. As amostras de sangue foram coletadas pela veia cava inferior em diferentes momentos após o tratamento (0 -10 horas), utilizando 1 animal por amostra

coletada. As atividades anti-FXa ou anti-FIIa (UI/mL) foram determinadas por ensaios na presença de antitrombina, onde curvas de inibição destas proteases foram construídas com diluições seriadas de cada amostra de plasma e comparadas com curva padrão obtida de plasma com concentração conhecida de HNF suína.

#### **2.1.5 Avaliação do efeito hemorrágico das diferentes amostras de heparina**

O efeito hemorrágico das heparinas foi avaliado em modelo de sangramento *in vivo* descrito por SANTOS *et al*, 2022. Resumidamente, animais C57Bl/6 WT foram tratados por via SC com diferentes doses de LABH (8 a 40 mg/kg), HNF suína (1 a 16 mg/kg), enoxaparina (8 a 16 mg/kg) e soro fisiológico (NaCl 0,9%, SF) (grupo controle). O sangramento foi quantificado após 1 hora da administração a partir da coleta de sangue derramado de cortes (1mm de diâmetro) nas caudas dos animais submersas em recipientes contendo 1,5mL água destilada. O sangue foi coletado nos primeiros 10 minutos e, em seguida, após troca do recipiente, nos 50 minutos subsequentes. O grau de hemorragia foi estimado pelo teor de hemoglobina dissolvida na solução medindo-se a absorbância à 540 nm (Ultraspec 3100; Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

#### **2.1.6 Modelo de crescimento tumoral de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC)**

Animais C57Bl/6 WT foram randomizados para 4 grupos: LABH (N=11), enoxaparina (N=10), HNF suína (N=10) e soro fisiológico (SF) (N=13). Cada animal recebeu injeção de células tumorais por via SC ( $5 \times 10^5$  células em 60  $\mu$ L de PBS por animal) no dorso, seguido de tratamento diário 1 vez ao dia de preparações de heparinas ou SF por 26 dias (D2-D27). Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com cetamina (35 mg/kg de peso) + xilazina (9 mg/kg de peso) por via intraperitoneal (IP). Realizou-se perfusão dos pulmões com SF 0,9% seguida de retirada desses órgãos para contagem de focos metastáticos por macroscopia e por histologia, utilizando-se coloração Hematoxilina & Eosina (HE). Foram avaliados ainda no curso do experimento outros desfechos:

- a) Avaliação ectoscópica – foram procuradas mudanças visíveis nos animais e avaliadas quanto a sua gravidade. Úlceras foram definidas como critério para abreviação do término do experimento a fim de se reduzir sofrimento animal.

- b) Avaliação ponderal – semanalmente os animais eram pesados para avaliação da alteração evolutiva da massa corpórea. Ao final do experimento, analisamos a variação ponderal do D 1 ao D 28, subtraindo-se deste valor os pesos tumorais no D 28.
- c) Sobrevida – Analisamos diariamente óbito precoce dos animais. Todos os animais, incluindo os que sobreviveram até o dia 28, passaram por necropsia para avaliação de alterações macro-patológicas e identificação de possível *causa mortis*.
- d) Parâmetros tumorais – Os tumores eram medidos semanalmente com paquímetro em seus eixos crânio-caudal e látero-lateral. Após a morte de cada um dos animais os tumores foram ressecados, seus pesos medidos em balanças de precisão e seus volumes medidos por meio de deslocamento de água em uma coluna volumétrica.

### 2.1.7 Modelos de metástase induzida

A avaliação do potencial antimetastático da LABH foi realizada a partir de ensaios de metástase induzida utilizando-se células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) e de melanoma murino (B16F10).

No modelo de metástase induzida cada animal recebeu injeção de células tumorais por via IV, na veia da cauda, células LLC ( $5 \times 10^5$  células em 60  $\mu$ L) ou B16F10 ( $3 \times 10^5$  células em 60  $\mu$ L), 1h após a administração profilática por via SC da LABH ou de SF. Nestes ensaios foram empregados animais C57Bl/6 WT e P-selectin<sup>(-/-)</sup>, seguidos por 21 dias.

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com cetamina (35 mg/kg de peso) + xilazina (9 mg/kg de peso) por via IP. Realizou-se perfusão dos pulmões com SF 0,9% seguida de retirada desses órgãos para contagem de focos metastáticos por macroscopia e por histopatologia, por meio da coloração HE.

As doses de LABH utilizadas no modelo com células LLC foram aplicadas em animais WT dose profilática + doses diárias via SC de 20 mg/kg (ensaios DD), ou dose única profilática via SC de 10 mg/kg ou 20 mg/kg (ensaios DU). Nos animais P-selectin<sup>(-/-)</sup> foram administrados LABH 20 mg/kg em dose única via SC.

Para os ensaios com células de melanoma murino (B16F10) a intervenção foi de dose única profilática.

Neste modelo os animais WT foram randomizados em 4 grupos de LABH nas doses 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg e 20 mg/kg de peso; 1 grupo de HNF suína 8 mg/kg de peso e 1 grupo SF. Nos animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> foram administrados LABH 20 mg/kg ou SF.

Foram avaliados ainda no curso do experimento outros desfechos:

- a) Avaliação ectoscópica – foram procuradas mudanças visíveis nos animais e avaliadas quanto a sua gravidade.
- b) Avaliação ponderal – semanalmente os animais eram pesados para avaliação da alteração evolutiva da massa corpórea. Ao final do experimento, analisamos a variação ponderal do D 1 ao D 21;
- c) Sobrevida – Analisamos diariamente óbito precoce dos animais. Todos os animais, incluindo os que sobreviveram até o dia 21, passaram por necropsia para avaliação de alterações macro-patológicas e identificação de possível *causa mortis*.

### 2.1.8 Análise histológica

As peças anatômicas (tumor e pulmões) foram fixadas em formol tamponado a 10%, emblocados em parafina, cortados para confecção de lâminas e estas foram coradas com HE. A contagem dos focos metastáticos foi realizada de forma cega pela médica patologista Ana Helena Correia, do Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF. A avaliação dos focos tumorais contou com o microscópio Zeiss AX10.

### 2.1.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Origin Pro, a partir do método ANOVA *one-way* para comparação entre os grupos, tendo  $p < 0,05$  como parâmetro de significância.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Fracionamento da LABH

Na cromatografia de filtração em gel a distribuição do tamanho das cadeias da HNF de intestino bovino é semelhante às de intestino suíno (Fig. 4), indicando não

haver diferenças significativas do peso molecular médio entre essas duas preparações de HNF.

Por outro lado, a HNF suína exhibe uma homogeneidade no grau de sulfatação da glucosamina em suas unidades dissacarídicas, onde o resíduo dissulfatado (Glc-NS,6S) é o mais presente (Figura 1), enquanto a HNF de intestino bovino tem uma quantidade expressiva de unidades dissacarídicas onde a glucosamina não apresenta sulfatação no carbono 6, exibindo sulfatação só no seu grupamento amino (Glc-NS) (Figura 3). Essa diferença no grau de sulfatação tem como consequência uma diminuição do potencial anticoagulante da HNF bovina quando comparada à HNF suína, ~ 100 UI/mg e ~200 UI/mg, respectivamente.

As unidades de Glc-NS não são homogeneamente distribuídas ao longo das cadeias da HNF bovina, resultando em populações de cadeias com graus de sulfatação distintos (Figura 3). Podemos explorar essa diferença na densidade de carga entre as cadeias na cromatografia de troca iônica, obtendo população de cadeias enriquecida em resíduos de Glc-NS em suas unidades dissacarídicas e outra onde os resíduos de Glc-NS,6S estão mais concentrados.

Este tipo de fracionamento é exemplificado na Figura 5 (retirada de Tovar *et al*, 2019), onde a recuperação do material retido na coluna é feita com sal através de uma combinação sequencial de eluição por gradiente e eluição isocrática (em degraus). Diferentes concentrações de NaCl podem ser aplicadas na segregação entre as populações de cadeias, denominadas fração 1 (F1) e fração 2 (F2), protocolos 1, 2 e 3 (Figura 5 A, B e C, respectivamente). Quanto menor for a concentração de sal na obtenção da F1 (Figura 5 A, protocolo 1), maior a proporção de resíduos de Glc-NS evidenciada na ressonância magnética nuclear desta fração (Figura D, F1 protocolo 1). Dependendo do protocolo utilizado podemos obter populações de cadeias que se assemelham às da HNF suína (Figura 5 D, F2 protocolos 2 e 3, E).

O potencial anticoagulante das frações obtidas nos diferentes protocolos foi avaliado em ensaios de TTPA (Figura 6). Podemos constatar uma clara correlação entre o grau de sulfatação das cadeias e sua atividade anticoagulante.

A fração F1 do protocolo 1, correspondente à população de cadeias com menor atividade anticoagulante, foi a escolhida como a LABH para os nossos experimentos.

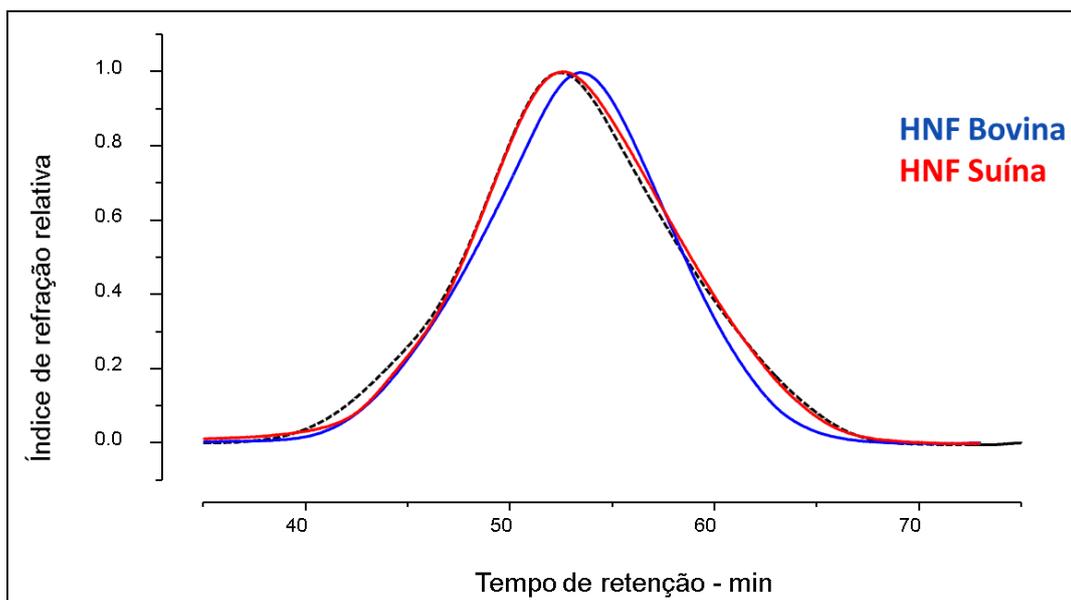


Figura 4. Perfil de eluição de HNF suína (vermelho), HNF bovina (azul) e calibrante de peso molecular (linha tracejada) em cromatografia de filtração em gel. (Adaptado de TOVAR, 2019).

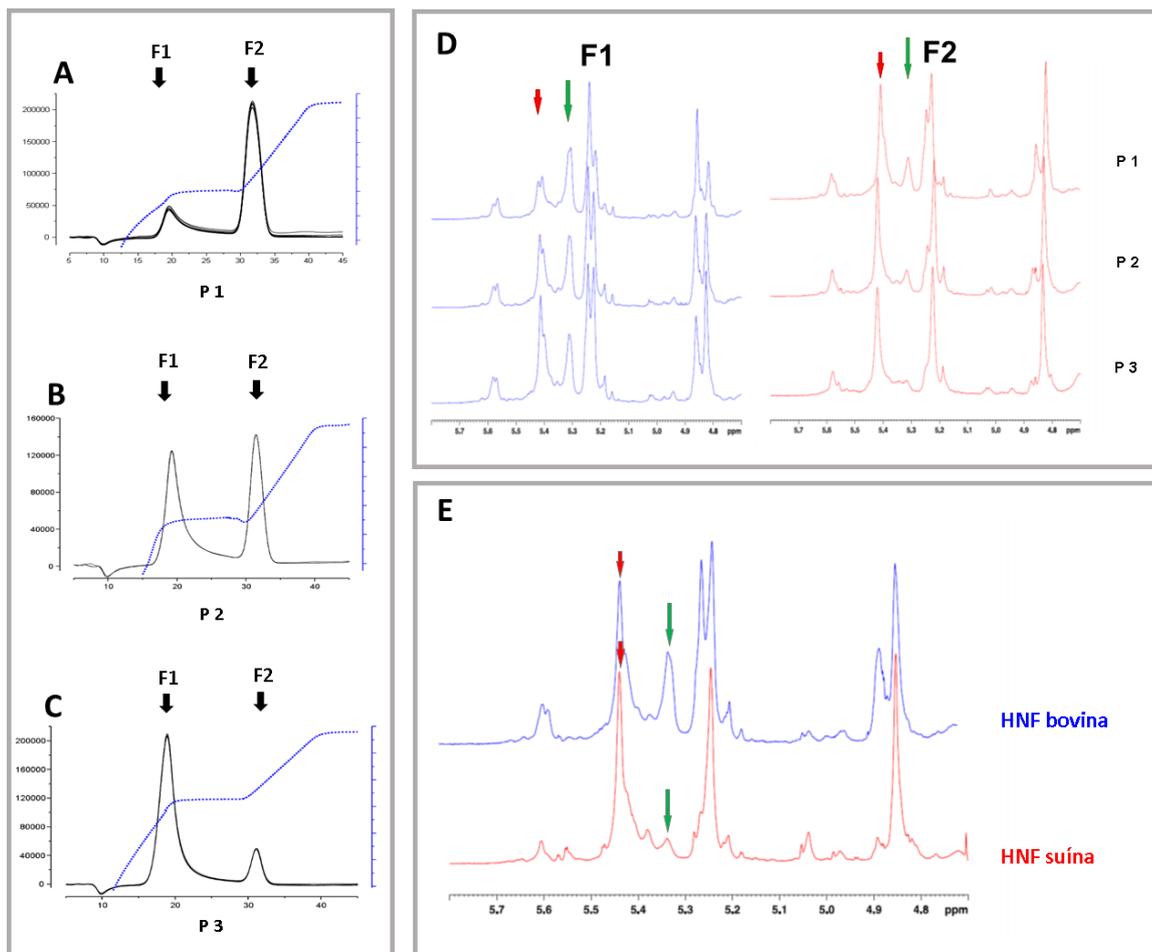


Figura 5. Protocolos (P) distintos de separação por cromatografia de troca iônica de duas frações (F1: fração 1, F2: fração 2) de HNF bovina e seus respectivos espectros de ressonância magnética nuclear (1D  $^1\text{H}$  RMN). A, B e C: cromatografia de troca iônica, protocolos 1, 2 e 3 respectivamente; D: perfis 1D  $^1\text{H}$  RMN das frações obtidas nos diferentes protocolos. E: perfis 1D  $^1\text{H}$  RMN das HNF suína e bovina. Setas verdes: sinal correspondente às unidades de glucosamina N-sulfatada; setas vermelhas sinal correspondente às unidades de glucosamina N,6 dissulfatadas (Adaptado de TOVAR, 2019).

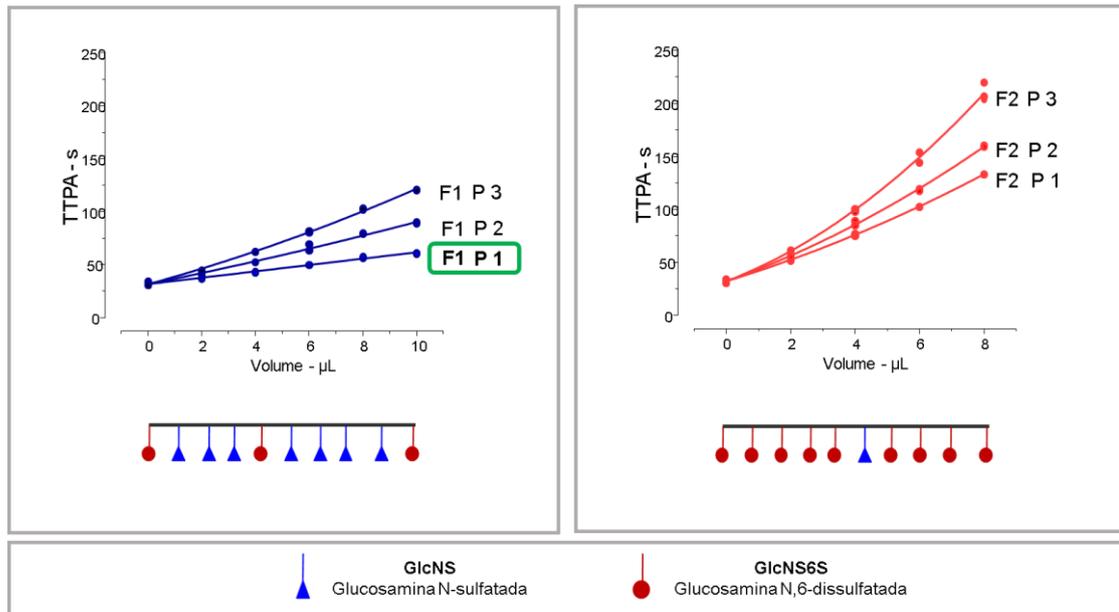


Figura 6. Potencial anticoagulante de frações da HNF bovina. Ensaio de TTPA das frações (F1 e F2) obtidas a partir de protocolos distintos. Azul = F1 e Vermelho = F2. Soluções preparadas com 50 µg/mL. P = protocolo.

### 2.2.2 Perfil anticoagulante *in vitro* da LABH em comparação a HNF suína e enoxaparina

Avaliamos a atividade anticoagulante *in vitro* da LABH com base nas atividades anti-FIIa e anti-FXa e comparamos o efeito com os de HNF suína e da enoxaparina (figura 7). Claramente, os três tipos de heparinas diferem em suas atividades. LABH e HNF suína têm atividade anticoagulante baixa e alta em ambos os ensaios, respectivamente. Em contraste, a enoxaparina mostrou significativa atividade anti-FXa, mas baixa atividade anti-FIIa, como esperado. O perfil distinto de LABH em ensaios anticoagulantes indicou que este tipo de heparina também pode ter efeitos terapêuticos diferentes da HNF suína e da enoxaparina em condições patológicas não hemostáticas.

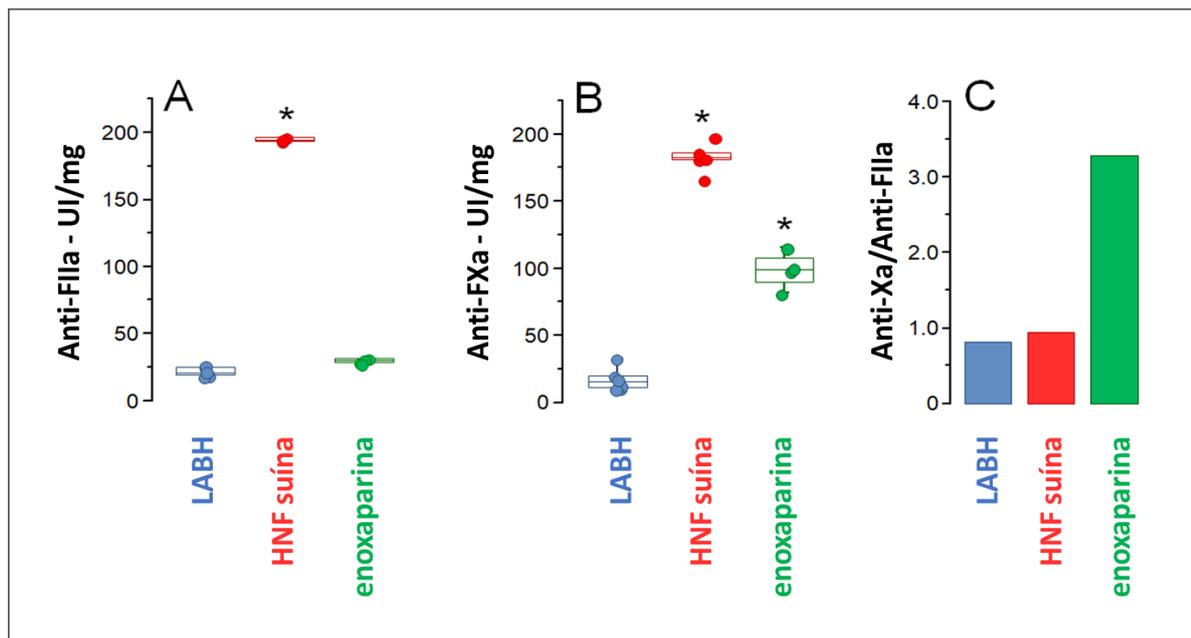


Figura 7. Atividades anti-fator IIa (A), anti-fator Xa (B) e as razões entre essas duas atividades (C) do LABH, HNF suína e enoxaparina. As atividades foram determinadas usando ensaios anti-FIIa e anti-FXa, conforme descrito na metodologia. Os resultados expressos em UI/mg foram calculados com base em ensaios de linha paralela realizados com o 6º Padrão Internacional de HNF para LABH e HNF suína e com o 3º padrão internacional de HBPM para enoxaparina. \* indica  $p < 0,05$ .

### 2.2.3 Absorção e farmacocinética

O próximo passo para propor o uso terapêutico do LABH é assegurar sua absorção após administração SC e definir seu perfil farmacocinético. Para atingir este objetivo LABH, HNF suína e enoxaparina foram administrados por via SC a camundongos em doses ajustadas para garantir suas detecções no plasma pelo ensaio anti-FXa (figura 8A, quadro 1). A baixa atividade anticoagulante de LABH requer sua administração em dose elevada (20 mg/kg) para viabilizar sua detecção no plasma de camundongos. LABH e HNF suína têm perfis farmacocinéticos semelhantes, estimados pelo tempo necessário para atingir suas concentrações plasmáticas máximas ( $T_{max}$ ) e o tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ), distinto do perfil de enoxaparina (figura 8B e quadro 1).

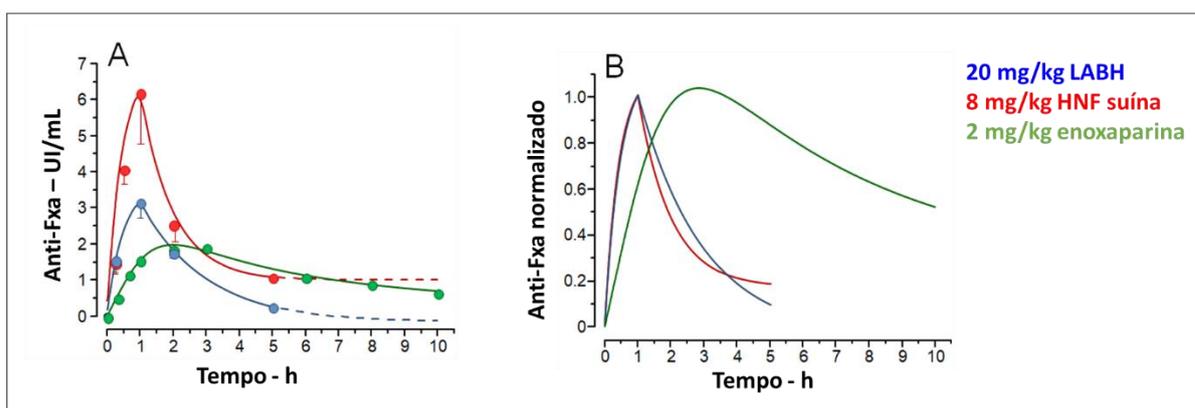


Figura 8. Perfis farmacocinéticos de enoxaparina, HNF suína e LABH nas doses de 2, 8 e 20 mg/Kg de peso corporal, respectivamente, administradas SC em camundongos. Amostras de sangue foram coletadas pela veia cava inferior em diferentes períodos de tempo e as concentrações de heparina no plasma foram determinadas pelo ensaio anti-FXa. O gráfico A mostra os resultados efetivos e o gráfico B os dados para cada heparina normalizado para um valor máximo de 1.

	T max (h)	T1/2 (h)	ASC <sub>0-10h</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	C max (µg/mL) <sup>a</sup>	MM (Da) <sup>b</sup>
LABH	1	0.84±0.3	42.0	16.5	~13,500
HNF suína	1	1.52±0.8	25.5	8.5	~17,000
enoxaparina	2	4.89±0.2	126.0	19.9	~4,500

Quadro 1. Parâmetros farmacocinéticos Tmax (tempo para atingir a concentração plasmática máxima), T1/2 (meia-vida de eliminação), ASC 0-10h (área sob a curva) e C max (concentração plasmática máxima) e massas moleculares (MM) de LABH, HNF suína e enoxaparina.

<sup>a</sup> Valores em µg de heparina por mL de plasma referentes às doses normalizadas (2 mg/kg) e potência específica (UI/mg) de cada heparina.

<sup>b</sup> Dados de Tovar, 2019 e Oliveira, 2015.

Claramente, observamos uma semelhança entre os perfis farmacocinéticos de LABH e HNF suína, distinta do perfil da enoxaparina. Quando as concentrações plasmáticas máximas (Cmax) e também a área sob a curva (ASC) das concentrações plasmáticas foram normalizadas pelas potências máximas respectivas de atividades

anti-FXa, observamos uma correlação inversa entre esses parâmetros e os pesos moleculares das heparinas (quadro 1).

É sabido que a atividade anti-FIIa das heparinas sofre influência do tamanho mínimo de suas cadeias enquanto a atividade anti-FXa é mais independente deste quesito.

A fim de avaliar se haveria alguma distinção quanto ao tempo ou velocidade de absorção das cadeias de heparina por essa via, realizamos ensaios paralelos de atividade anti-FXa e anti-FIIa, que demonstraram curvas similares. Isto sugere que cadeias de diferentes tamanhos e graus de sulfatação estão sendo absorvidos simultaneamente (figura 9).

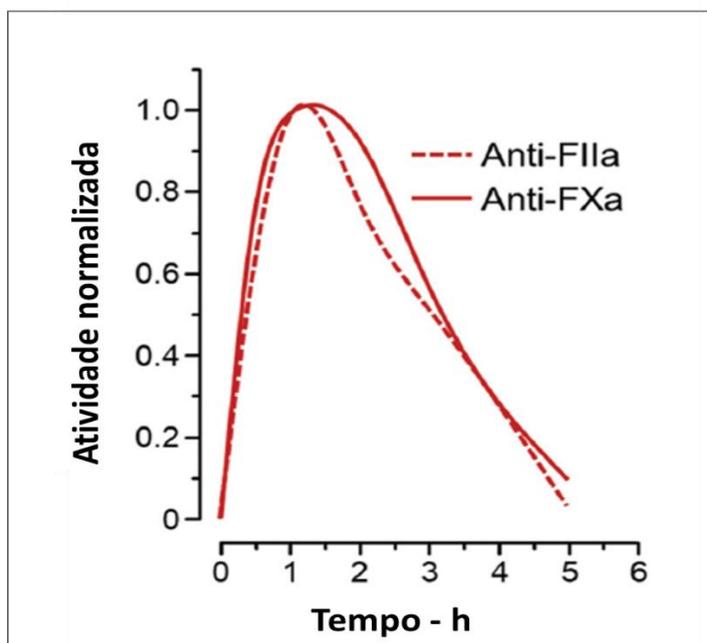


Figura 9. Comparação de perfis normalizados da concentração plasmática de HNF suína dosada por atividade anti-FXa (linha vermelha contínua) e anti-FIIa (linha vermelha tracejada).

#### 2.2.4 Efeito hemorrágico

O sangramento é o principal efeito adverso da heparina, especialmente no caso de HNF. É um obstáculo para o uso desse anticoagulante em doenças não tromboembólicas, que requer doses maiores de heparina do que em eventos tromboembólicos e longos períodos de administração. Desta forma, é de grande

relevância atestarmos a segurança da LABH quanto a este risco e comparar com as demais heparinas utilizadas em experimentos *in vivo*.

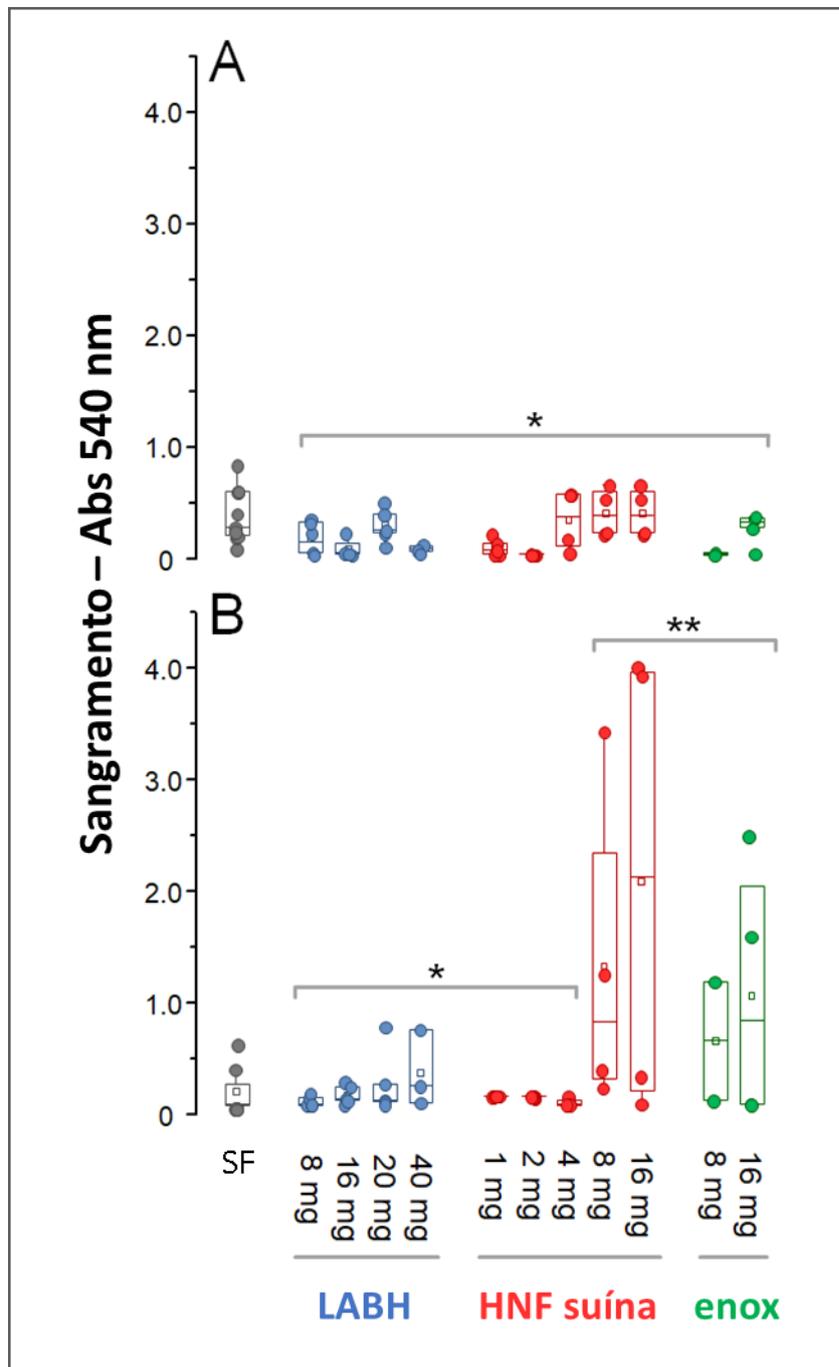


Figura 10. Avaliação de sangramento dos três tipos de heparinas. Diferentes doses de LABH, HNF suína e enoxaparina e SF (controle) foram administradas SC aos camundongos. O sangramento foi quantificado coletando-se sangue de cortes na cauda dos animais em água destilada por um período inicial de 10 min e nos 50 min subsequentes. A hemoglobina dissolvida foi determinada por absorbância a 540 nm. \* indica nenhuma diferença significativa e \*\*  $p < 0,05$ .

Avaliamos o sangramento a partir de cortes em caudas de camundongos após administração SC das heparinas. A perda sanguínea foi coletada em duas etapas: por um período inicial de 10 min (figura 10 A) e, após troca dos tubos, nos 50 min subsequentes (figura 10 B).

Nos 10 minutos iniciais de coleta de sangue (figura 10 A) nenhuma das heparinas provocou perdas de sangue significativamente maiores do que os animais controle, tratados com SF. Possivelmente, os mecanismos de hemostasia primária (por exemplo, vasoconstrição, alteração da permeabilidade vascular e adesão plaquetária) são capazes de amenizar o sangramento inicial mesmo nos animais heparinizados com HNF suína. Nos 50 min subsequentes, doses de HNF suína e enoxaparina acima de 8 mg/Kg resultaram em perdas de sangue significativamente maiores que os animais controle. Contudo, marcadamente, a administração SC da LABH não aumentou o sangramento, mesmo nos últimos 50 min (figura 10 B), exceto um efeito modesto na elevada dose de 40 mg/Kg. Em conclusão, a LABH é desprovida de efeito hemorrágico, que é a principal limitação para o uso de heparinas.

### 2.2.5 Avaliação do efeito antitumoral das diferentes heparinas

Nesse modelo os camundongos WT receberam células tumorais no tecido subcutâneo dorsal no D1 e doses subcutâneas de heparinas ou SF a partir do D2 ao D27. Foram acompanhados por 28 dias com avaliações diárias de alterações ectoscópicas e semanais de peso e de área tumoral. Este ensaio de crescimento tumoral costuma ser conduzido por 14 a 21 dias. Contudo, foi optado por estendê-lo ao D28 com o objetivo de avaliar concomitantemente além do crescimento tumoral a possível incidência de metástases espontâneas.

Os grupos tratados com LABH e enoxaparina apresentaram expressiva redução de mortalidade comparados ao grupo controle e ao grupo tratado com HNF suína (20%, 20%, 40%, 60%, respectivamente) (figura 11 A). Cerca de 50% dos animais tratados com HNF suína que morreram precocemente apresentaram ao exame anatomopatológico *post mortem* extenso hematoma dorsal no local da aplicação das injeções, além de hemorragias pulmonares, sugerindo sangramento

como *causa mortis* ou ao menos fortemente contribuinte para o óbito. Tais achados não ocorreram em nenhum outro grupo. As mortes precoces do grupo SF ocorreram em grande parte por abreviamento do sofrimento animal em casos de úlcera. As demais mortes foram espontâneas e inesperadas.

Dentre os animais que sobreviveram até o D28, o grupo tratado com LABH apresentou incremento ponderal médio de aproximadamente 11% (2,4g), similar ao de animais saudáveis, aproximadamente 14% (3,27g), enquanto aqueles tratados com HNF suína e enoxaparina apresentaram um incremento ponderal modesto de 3% e 6%, respectivamente. Os animais que receberam SF tiveram um decréscimo ponderal na ordem de 9%, (figura 11 B).

Trinta e três por cento (5/15) dos animais do grupo SF apresentaram tumores infiltrantes, enquanto o grupo LABH, HNF suína e enoxaparina apresentaram 10% (1/10), 0% (0/10) e 12,5%(1/8), respectivamente. A incidência de tumores complicados nesses grupos, correspondente a soma de tumores infiltrantes e ulcerados, foi de aproximadamente 54% (8/15), 33% (3/10), 43% (3/7), 12,5% (1/8), respectivamente (figura 12). Não foi observado o desenvolvimento tumoral em 4 animais durante os 28 dias de experimento (1 do grupo SF, 1 do LABH e 2 do enoxaparina), sendo excluídos da análise neste estudo.

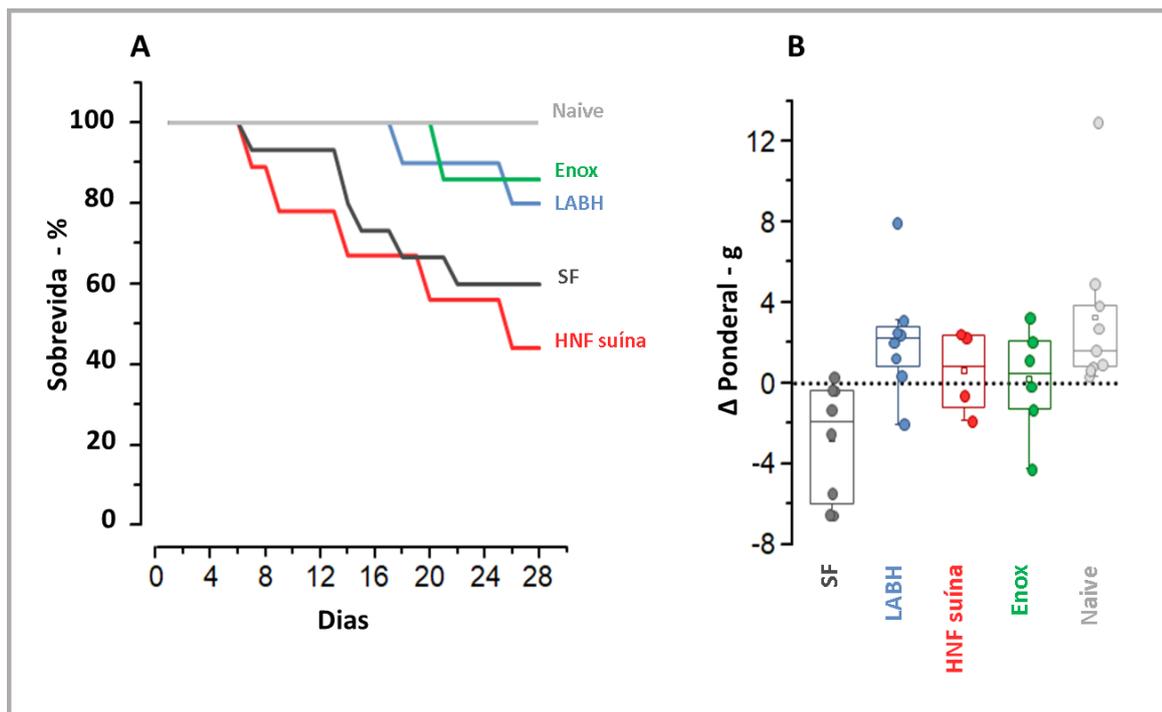


Figura 11. Ensaio de crescimento tumoral com células LLC. Sobrevivência relativa (A) e variação ponderal corporal (B) de camundongos tratados com os diferentes tipos de heparinas, ou com SF (controle) e animais em que não foram inoculadas células neoplásicas (*naive*).

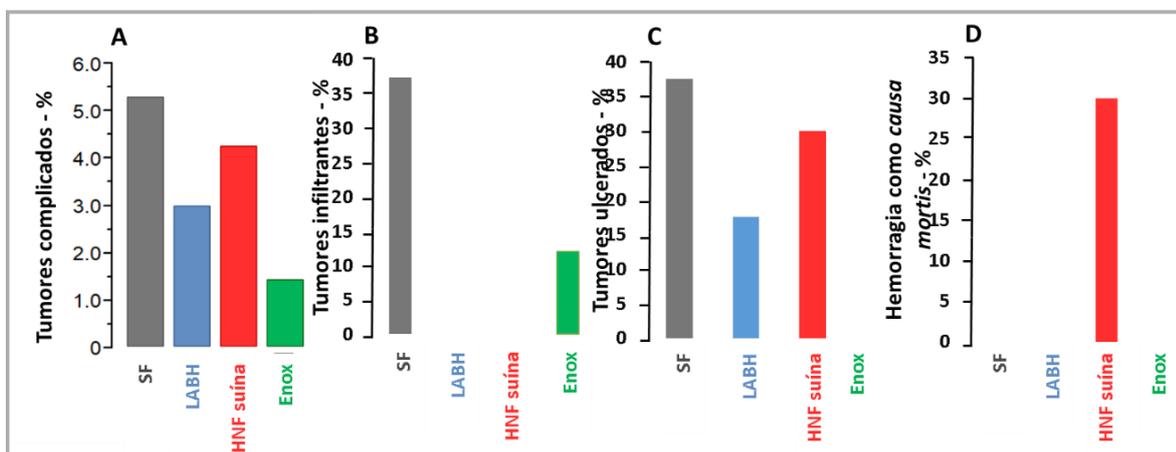


Figura 12. Ensaio de crescimento tumoral com células LLC. Porcentagem de tumores complicados A) totais (ulcerados + infiltrantes), B) infiltrativos, C) ulcerados. D) Percentual de animais com óbito precoce associado a extensa hemorragia interna.

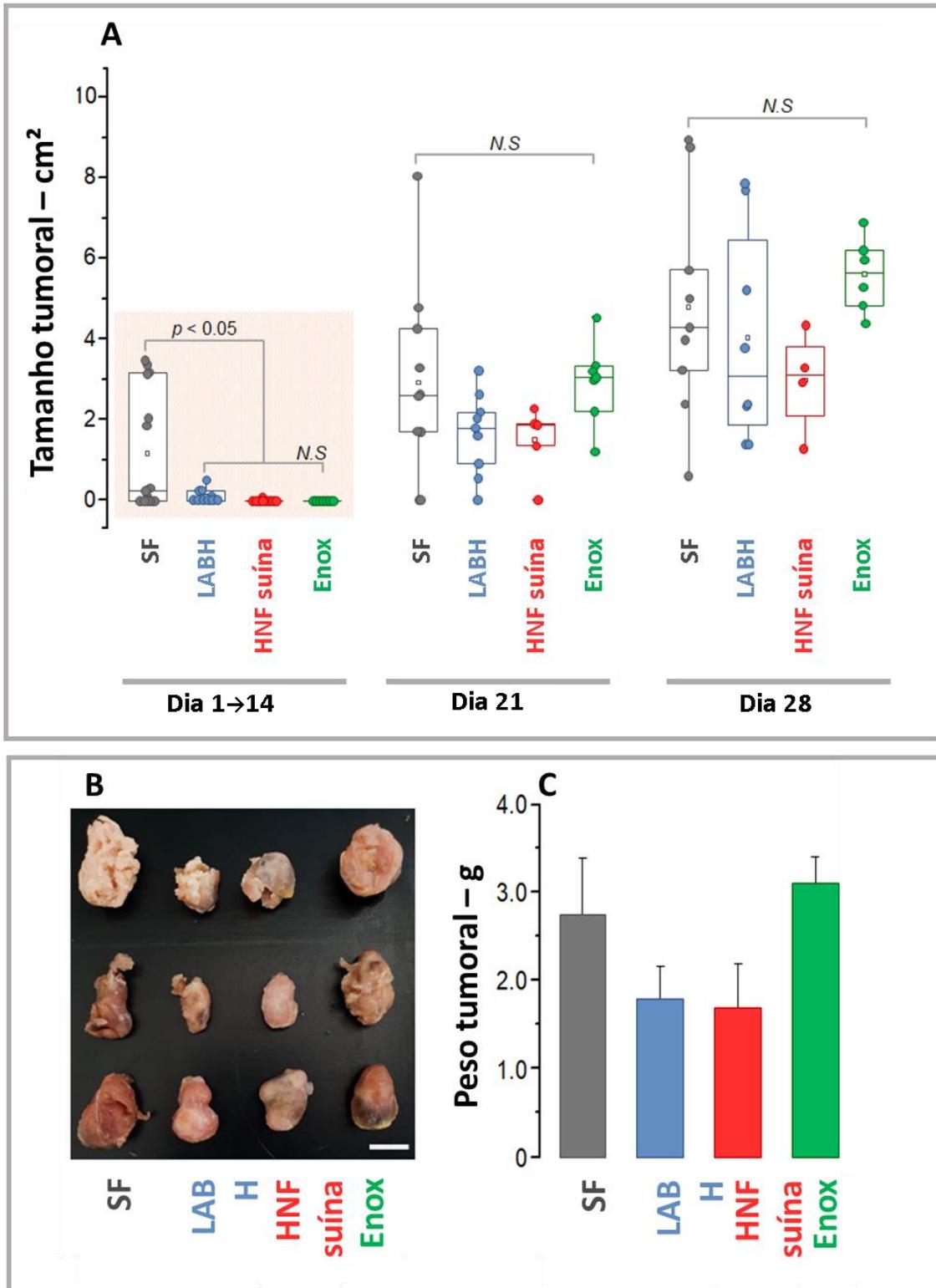


Figura 13. (A) Ensaio de crescimento tumoral com células LLC em camundongos tratados com LABH, HNF suína, enoxaparina e SF (controle); (B) amostras de tumores ressecados dos diferentes grupos; (C) variação de peso dos tumores ressecados no 28º dia dos diferentes grupos.

Apenas um animal do grupo SF apresentou tumor no sétimo dia, nos demais começaram a ser detectados e medidos a partir do décimo quarto dia de experimento. Notamos que o grupo SF apresentou um maior número de animais com tumor detectável até D 14 (9/15 animais), enquanto nos demais tratados com LABH (4/10 animais), HNF suína (1/6 animais) e enoxaparina (0/8 animais) o número foi menor. Verificamos também uma tendência de as áreas tumorais serem maiores no grupo tratado com SF ( $1.84 \pm 1,47 \text{ cm}^2$ , N=8) quando comparadas com as do grupo de tratamento com LABH ( $0.28 \pm 0,19 \text{ cm}^2$ , N=4) ou HNF suína ( $0.12 \text{ cm}^2$ , N=1) neste décimo quarto dia (Figura 13 A). No conjunto, esses dados apontam para um atraso de crescimento tumoral nos grupos tratados com as heparinas. Entretanto, no D 28 as áreas entre os diferentes grupos foram similares.

No D 28 do experimento, os animais que sobreviveram foram sacrificados e seus tumores ressecados (figura 13 B). A avaliação do peso do tumor nos diferentes grupos é mostrada na figura 13 C. Os grupos LABH e HNF suína apresentaram menores médias e medianas, entretanto sem significância estatística.

A análise macroscópica (dos órgãos em geral) e microscópica (dos pulmões) não demonstrou metástases. Uma vez que neste estudo não houve detecção de metástases pulmonares espontâneas, pela análise macro e microscópica, em nenhum dos grupos, não foi possível concluir acerca do efeito antimetastático das moléculas testadas neste modelo.

Estes resultados foram compilados e publicados em 2022 na revista *Thrombosis and Haemostasis*, em anexo (SANTOS, 2022).

#### **2.2.6 Modelo de metástase induzida**

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo. Os principais sítios de tumores primários são mama, pulmão, cólon/reto e próstata. Diversos fatores se relacionam com o pior prognóstico, como grau de invasão, resistência a fármacos e desenvolvimento de metástases, que configura a principal forma de letalidade direta das neoplasias (WHO, 2022).

É bastante reconhecida que a interação das plaquetas com a célula tumoral facilita o desenvolvimento de metástases. Esta interação é mediada principalmente pela P-selectina expressa na superfície das plaquetas e mucoproteínas (ex: PSGL-1) da célula tumoral. A heparina ao interagir com a P-selectina inibe, de forma

competitiva, a interação de plaquetas com a célula tumoral dificultando a formação de metástases (FABRICIUS, 2021).

Considerando que não foram observadas metástases espontâneas nos ensaios de crescimento tumoral, realizamos uma nova abordagem experimental, em que as células tumorais são injetadas diretamente na veia da cauda do animal, na tentativa de simular o evento metastático no momento que a célula tumoral atinge a circulação sanguínea.

Neste protocolo a amostra de heparina é administrada por via SC 1h antes das células neoplásicas serem injetadas por via IV. Os animais são acompanhados por 21 dias, quando são sacrificados, tendo seus órgãos perfundidos, os pulmões avaliados macroscopicamente quanto à presença de nódulos metastáticos e processados para avaliação microscópica.

Dois tipos de células tumorais murinas foram utilizadas aplicando-se este modelo de metástase induzida, as células LLC (carcinoma pulmonar de Lewis) e células B16F10 (melanoma).

Nas baterias de testes além dos animais WT utilizamos camundongos *knock-out* para P-selectina (P-selectina<sup>-/-</sup>) para avaliar se a ação da LABH, se observada, seria exclusivamente dependente desta proteína no processo metastático. Faz-se importante ressaltar que o padrão de sulfatação da heparina pode ter interferência na sua ligação à P-selectina. Há de se sublinhar, ainda, que a LABH dispõe de diferenças neste padrão em relação à HNF suína (figura 5).

#### 2.2.6.1 Modelo de metástase induzida com células LLC

O efeito antimetastático foi avaliado de duas maneiras: a) animais (WT) receberam LABH SC (20mg/kg) ou SF 1 hora antes de injeção IV das células, seguido de doses diárias (DD) LABH SC (20 mg/kg, N=9) ou SF (N=9) por mais 19 dias (DD); b) animais WT receberam apenas dose única LABH SC (10mg/kg, N=5 ou 20mg/kg, N=5) ou SF (N=3) 1 hora antes de injeção IV das células (DU). Animais P-selectina<sup>-/-</sup> também foram empregados, randomizados entre LABH SC 20mg/kg DU (N=10) e SF (N=10), comparados com um grupo SF WT (N=3).

Neste conjunto de ensaios apenas 2 animais evoluíram a óbito muito precocemente, no D 2 (LABH 20mg/kg DU) e outro no D 4 (LABH 20mg/kg DD), por causa indeterminada e sem evidências de sangramento.

Não foram evidenciadas alterações comportamental, ponderal, ectoscópicas em nenhum grupo.

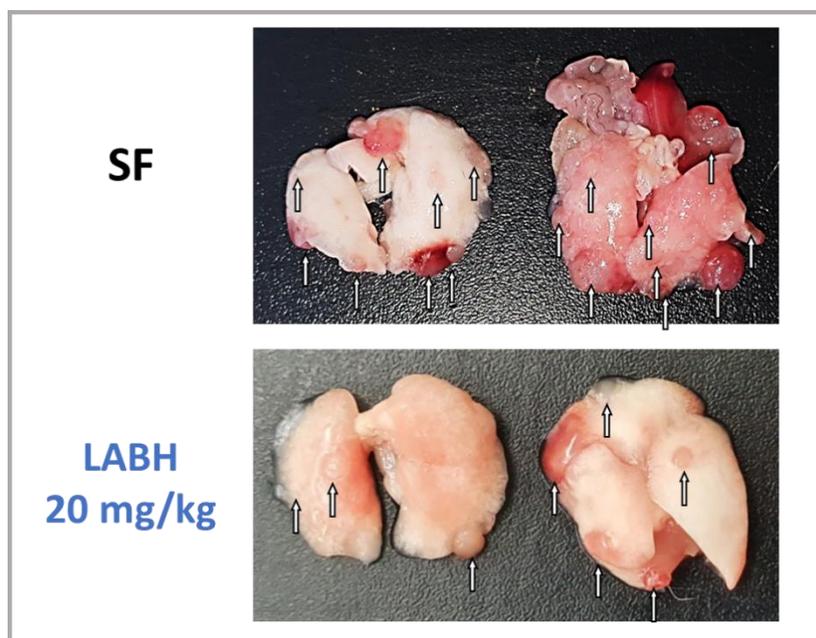


Figura 14. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Imagem ilustrativa de fotografias representativas de pulmões dos grupos de animais WT SF e LABH 20mg/kg DU. Setas: metástases pulmonares.

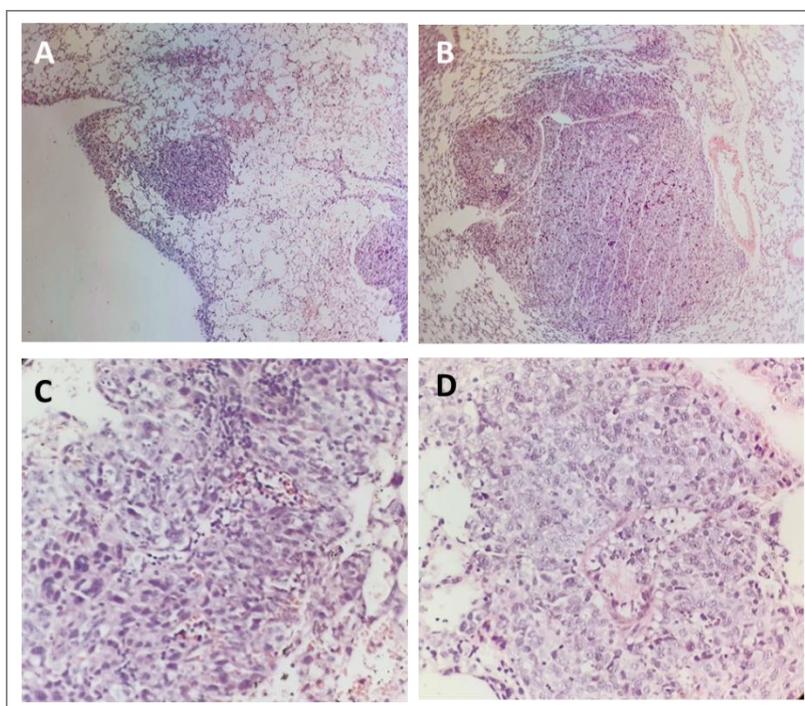


Figura 15. Ensaio de metástase induzida com células LLC. Imagens ilustrativas de microscopia óptica de lâminas de pulmão murino coradas com Hematoxilina & Eosina evidenciando focos metastáticos. A e B) aumento 100x, C e D) aumento 400x.

As figuras 14 e 15 ilustram os achados macroscópicos e microscópicos dos focos tumorais, respectivamente.

#### 2.2.6.1.1 Ensaio com tratamento diário (DD)

Nos ensaios em que os animais que receberam doses diárias (SF, N=9 ou LABH 20 mg/kg, N=8), à observação macroscópica constatamos um maior número de focos tumorais pulmonares no grupo SF, 6 em 9 animais deste grupo apresentaram tumores detectáveis macroscopicamente (variando de 1 a 6 tumores/animal) enquanto no grupo LABH só identificamos tumor em 2 dos 8 animais, apresentado 1 tumor cada (figura 16).

Na análise microscópica dos pulmões deste conjunto de experimentos, somente em 1 dos 8 animais do grupo LABH foram encontrados focos metastáticos enquanto no grupo controle (SF) essa proporção foi de 5 em 9 animais. O número de focos metastáticos foi maior nos animais do grupo controle macro (figura 16A) e microscopicamente (figura 16B), verificando-se uma boa correlação entre o número de focos macroscópicos e microscópicos (figura 17). Por outro lado, no único animal do grupo LABH em que foram encontrados 6 focos tumorais à microscopia, esses focos conjuntamente comprometiam somente 5% da área pulmonar avaliada (figura 18). A LABH reduziu a área pulmonar total acometida por metástases (figura 18A) e reduziu o tamanho dos focos metastáticos (figura 18B).

Estes resultados apontam para uma provável inibição na instalação e/ou desenvolvimento de focos metastáticos pela LABH.



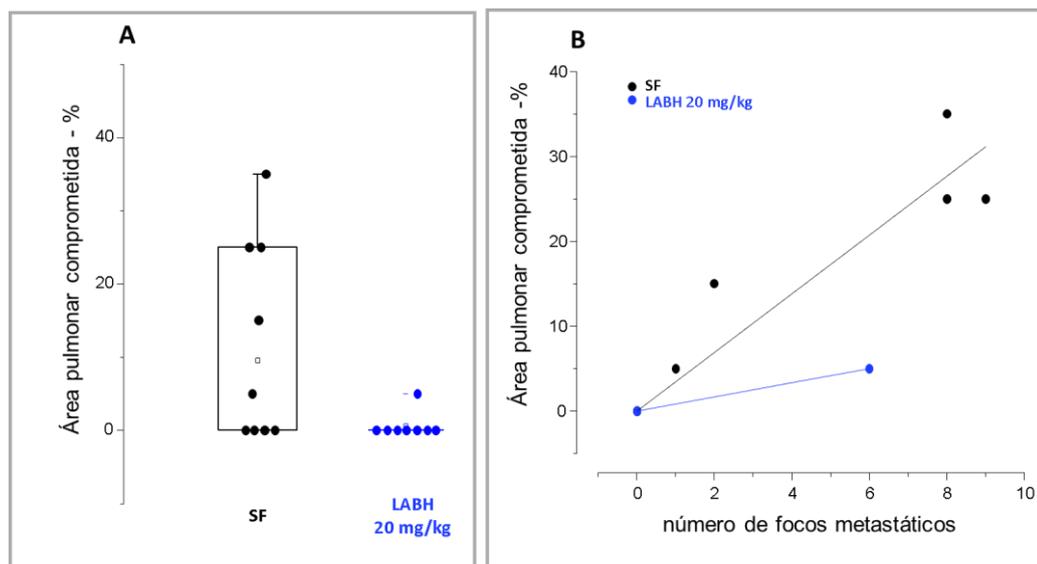


Figura 18. Ensaio de metástase induzida com células LLC, animais C57Bl/6 WT. A) Percentual de área pulmonar acometida por metástases à microscopia; B) Correlação entre área pulmonar acometida e focos metastáticos à microscopia. Preto = SF; azul = LABH 20 mg/kg dose diária (DD).

#### 2. 2.6.1.2 Ensaio com dose única (DU)

Nesta abordagem além dos animais WT os *knockout* para P-selectina (P-selectina<sup>(-/-)</sup>) foram incluídos nos experimentos, sublinhando-se que cada animal recebeu uma única dose SC (SF ou LABH) 1 hora antes das células tumorais serem inoculadas na veia da cauda.

O tratamento com a LABH compreendeu dois grupos de animais WT, com animais recebendo dose única de 10mg/kg (N=5) ou 20mg/kg (N=5), comparados com SF (N=4).

Os resultados referentes a esses experimentos estão mostrados na figura 19. Dois dos quatro animais controle morreram precocemente, porém observamos uma tendência a um menor número de tumores nos pulmões dos animais tratados com a LABH em relação ao grupo controle (SF), tanto na análise macroscópica quanto na microscópica.

Para termos uma ideia a respeito da importância da P-selectina expressa na superfície das plaquetas na instalação dos focos tumorais neste modelo comparamos o número de tumores encontrados nos animais WT que receberam SF com animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> que receberam SF (N=10) ou dose única de LABH 20mg/kg (N=10). Os

resultados estão mostrados na figura 20. Em 1 dos 3 animais do grupo SF WT (N=3) foi observado tumor no local da injeção IV das células, indicando má qualidade na aplicação, sendo descartado.

Ao compararmos os animais WT com os P-selectina<sup>(-/-)</sup> que receberam SF vemos uma clara tendência a um menor número de tumores nos pulmões destes últimos, reproduzindo os achados reportados na literatura científica, o que ratifica a importância da P-selectina na formação de metástases. Por outro lado, nos animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> tratados com a LABH verificamos ainda menor número dos que apresentam tumores quando comparados a seus pares P-selectina<sup>(-/-)</sup> que receberam SF, sugerindo um efeito da LABH independente de P-selectina.

Os experimentos acima relatados foram realizados em diferentes datas e para cada bateria de experimento havia um grupo de animais WT controle (SF). Como as células tumorais passam por procedimentos prévios para cada bateria do estudo é possível haver certas diferenças no comportamento da célula tumoral de um preparo para outro, podendo influenciar o número total de metástases a ser alcançado. Desta forma, para ter uma ideia global da variação entre os diferentes grupos, os dados obtidos foram normalizados pela média de metástases observadas nos grupos WT controle respectivos e replotados em conjunto (figura 21).

Resumindo, os resultados encontrados nestes experimentos de metástase induzida empregando células LLC sugerem que LABH pode ter atuado tanto na redução da instalação das células neoplásicas quanto no desenvolvimento das metástases. Em outras palavras, estaria exercendo atividade antimetastática e antitumoral. Evidências da literatura demonstram que a P-selectina possui um papel importante no desenvolvimento de metástases, que pode ser atenuado por heparinas. Nossos resultados demonstram menor incidência de metástase em animais *knockout* para P-selectina que receberam SF. Isto indica que a ocorrência de metástases depende, ao menos em parte, da presença de P-selectina neste modelo, o que está congruente com a literatura. Ademais, o tratamento com LABH DU em animais *knockout* para P-selectina apresentou um incremento de efeito antimetastático observado sem, contudo, alcançar significância estatística. Esses dados realçam o papel da P-selectina no processo de metástase, porém não pudemos comprovar neste tipo de abordagem que o efeito antimetastático da LABH se dá através deste processo.

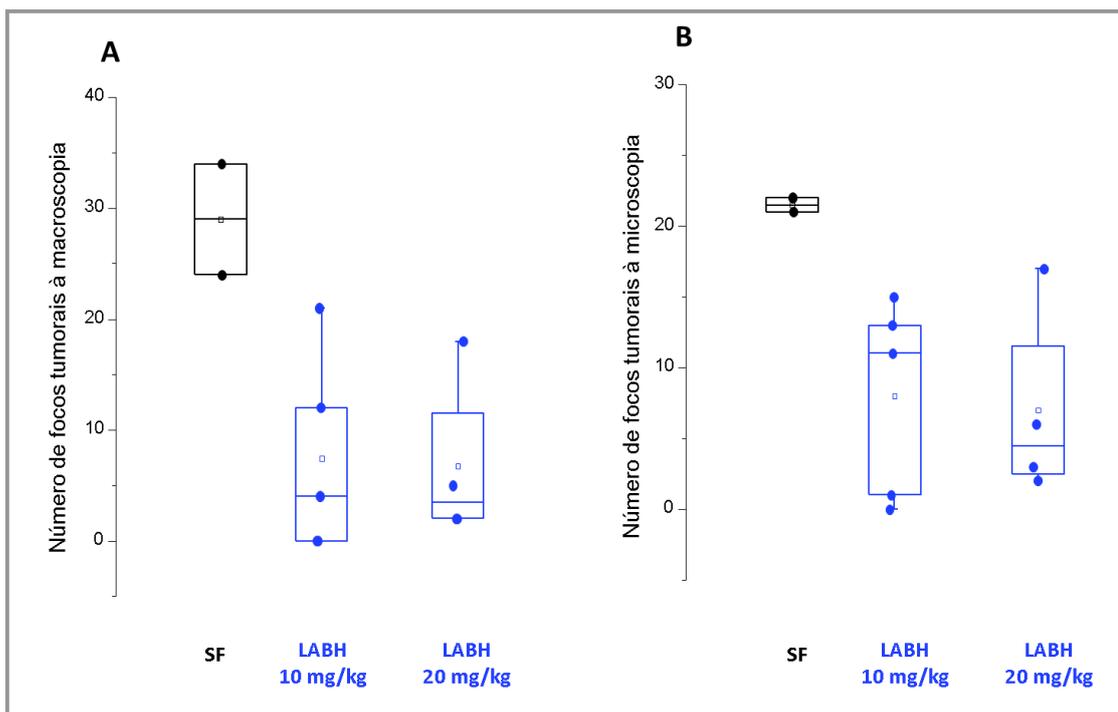


Figura 19. Ensaio de metástase induzida com células LLC, animais C57Bl/6 WT. (A) Número de focos tumorais à macroscopia; (B) número de focos tumorais à microscopia. Preto = SF; azul = LABH 20 mg/kg dose diária (DD).

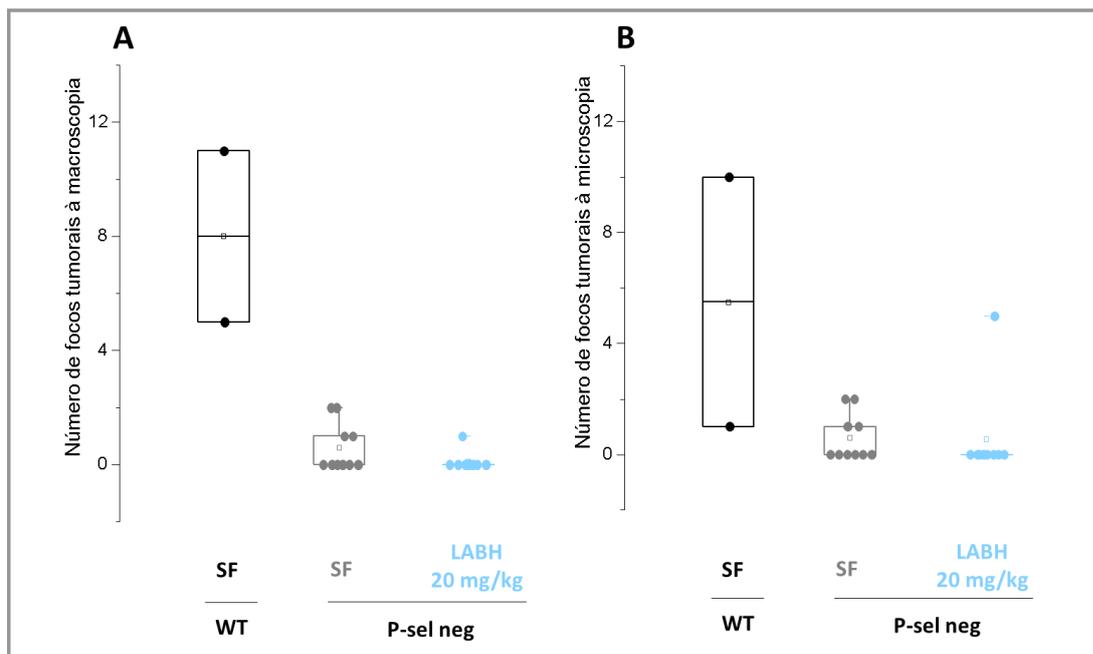


Figura 20. Ensaio de metástase induzida com células LLC, animais C57BI/6 WT e P-selectina<sup>(-/-)</sup>. (A) Número de focos metastáticos à macroscopia; (B) número de focos metastáticos à microscopia. SF WT (preto); SF P-selectina<sup>(-/-)</sup> (cinza); P-selectina<sup>(-/-)</sup> LABH 20 mg/kg (azul).

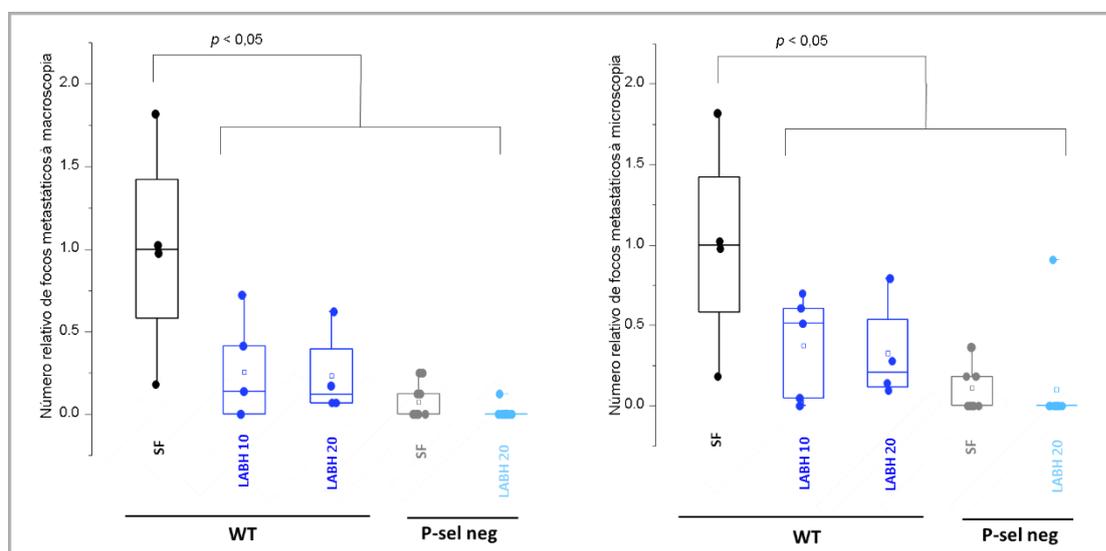


Figura 21. Ensaio de metástase induzida com células LLC, animais C57BI/6 e P-selectina<sup>(-/-)</sup>. Número relativo de focos metastáticos à macroscopia (A) ou microscopia (B). Grupo WT SF (preto); P-selectina<sup>(-/-)</sup> SF (cinza); grupo LABH (WT ou P-selectina<sup>(-/-)</sup>) (azul).

#### 2.2.6.2 Modelo de metástase induzida de células B16F10 (melanoma murino)

Os resultados apresentados até agora apontam para um provável efeito antitumoral e/ou antimetastático da LABH no modelo empregado com célula LLC. Para avaliarmos se estes achados também ocorrem em outros tipos de câncer, estendemos nossa abordagem sobre o estudo de efeito antimetastático para um modelo de melanoma murino.

Neste protocolo utilizamos animais WT e P-selectina<sup>(-/-)</sup>, e da mesma forma que o experimento anterior as células de melanoma (B16F10) foram injetadas na veia da cauda do animal 1 hora após da aplicação subcutânea de SF, ou LABH, ou HNF suína, dose única (DU), sendo os animais acompanhados durante três semanas. No 21º dia os animais foram sacrificados sob anestesia, seus órgãos perfundidos com SF e seus pulmões avaliados macroscopicamente quanto ao número de focos metastáticos.

Os ensaios com a LABH com animais WT foram divididos em 4 grupos que receberam diferentes doses: 2 mg/kg (N=6), 4 mg/kg (N=9), 8 mg/kg (N=10) e 20 mg/kg (N=5), comparados com HNF suína na dose de 8 mg/kg (N=9) e SF (N=20)

Os animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> foram randomizados em 2 grupos: LABH SC 20 mg/kg (N=9) e SF (N=10).

Neste modelo os animais mantiveram ganho ponderal em todos os grupos, sem diferenças significativas. Não houve modificação comportamental nem ectoscópica em nenhum camundongo. Não foram percebidos efeitos adversos hemorrágicos nos sítios de administração das heparinas nem em órgãos internos.

A figura 22 exemplifica o aspecto dos focos tumorais encontrados nos pulmões dos animais.

Nossos resultados mostram um efeito dose-dependente da LABH na redução do número de metástases encontrado (figura 24). Novamente pudemos constatar que os animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> que receberam SF exibem menor número de metástases que os WT controle (SF). Por outro lado o resultado com animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> que receberam LABH (20 mg/kg) foi significativamente diferente do obtido com seus pares que receberam SF (P-selectina<sup>(-/-)</sup>, SF), indicando um efeito da LABH independente de P-selectina (figura 23).

Em suma, de acordo com os resultados obtidos com as células LLC, o efeito antimetastático da LABH também pôde ser constatado sobre as células de melanoma murino, apontando para um mecanismo mais geral, não de um efeito tumor-específico.

Em nenhum dos dois tumores estudados pudemos associar o efeito antimetastático da LABH ser dependente da P-selectina, necessitando de uma outra abordagem experimental para elucidar esta questão.

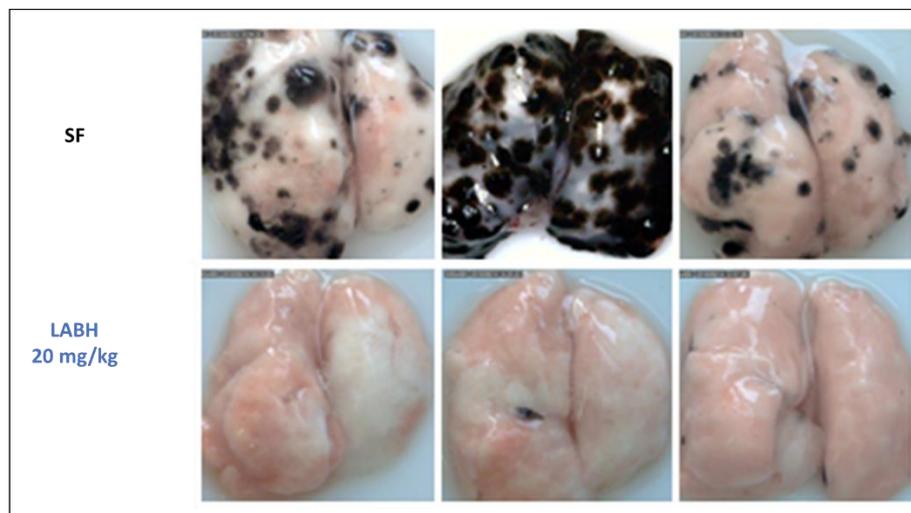


Figura 22. Imagens macroscópicas ilustrativas de metástases de melanoma (células B16F10). Pulmões de espécimes representativos de grupo controle (SF) e grupo pré-tratado com dose única por via SC de LABH (20 mg/kg) 1h antes da administração de células de melanoma.

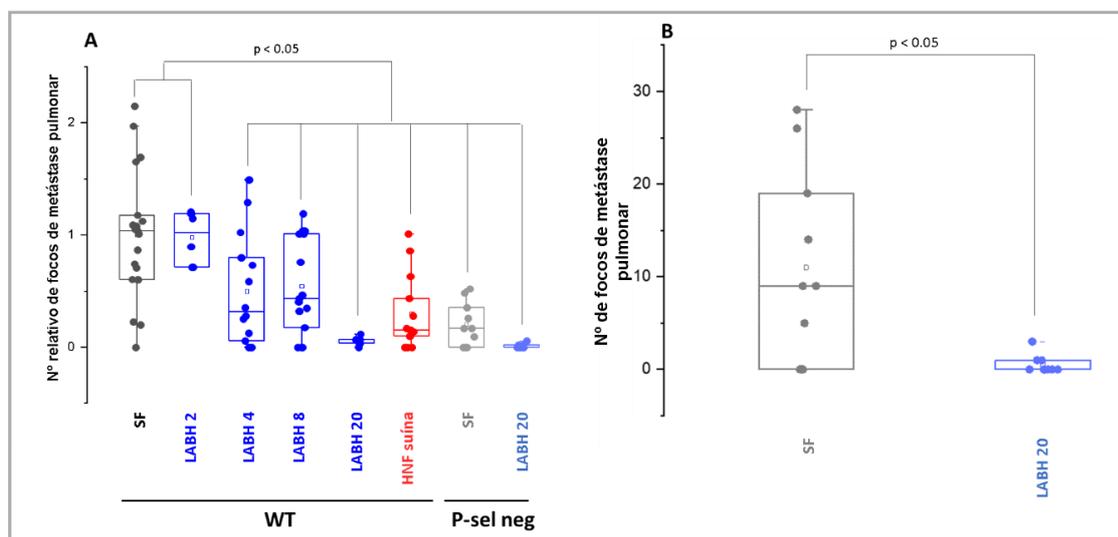


Figura 23. (A) Número relativo de focos metastáticos de melanoma B16F10 em animais WT e P-selectina<sup>-/-</sup> pré-tratados com LABH (2, 4, 8 e 20 mg/kg) ou HNF suína (8 mg/kg) comparados com SF. B) Número de focos metastáticos, comparação entre animais P-selectina<sup>-/-</sup> tratados com SF ou LABH 20mg/kg.

### 3 CONCLUSÕES

Esta tese inaugura os estudos exploratórios pré-clínicos da farmacocinética, da segurança e do potencial antitumoral e antimetastático de uma heparina com baixa atividade anticoagulante e analisa, ainda, desfechos biológicos complementares.

Foi demonstrado que a LABH possui baixa atividade anticoagulante *in vitro* em ensaios de PTTa, de atividade anti-IIa e anti-Xa. Ela é absorvida por via SC em camundongos e apresenta farmacocinética similar à da HNF suína, atingindo concentração sérica máxima em torno de 1h, porém com meia-vida menor que 1h. A LABH demonstrou baixo efeito hemorrágico *in vivo*, sendo segura até dose de 40mg/kg, que não se relacionou a aumento significativo do volume de sangramento.

Apresentou atividade antitumoral em ensaios de crescimento tumoral com células de LLC em camundongos C57Bl/6, com redução da velocidade de crescimento tumoral em 14 dias ( $p < 0,05$ ) e tendência de redução do tamanho final e do peso dos tumores. O grupo tratado com LABH não apresentou perda ponderal ( $p < 0,05$ ), mas sim ganho ponderal similar ao esperado para a idade, bem como menor letalidade e menores taxas de complicações tumorais e hemorrágicas. Nesses ensaios o uso de doses diárias de LABH se mostrou seguro.

Evidenciou-se atividade antimetastática em modelo de metástase induzida com células LLC. Houve redução de metástases macroscópicas ( $p < 0,05$ ) e microscópicas ( $p < 0,05$ ). Além disso, houve tendência de redução também do tamanho dos focos tumorais metastáticos, bem como da área metastática total. Esses resultados sugerem a ocorrência de um efeito inibitório tanto na instalação das metástases quanto no crescimento e desenvolvimento dos focos metastáticos instalados. Também nesses ensaios a LABH demonstrou ser segura tanto em esquemas de dose única quanto em doses diárias. Ademais, houve uma tendência a menor incidência metastática no grupo P-selectina<sup>(-/-)</sup> tratado com LABH. Isto aponta para um possível mecanismo de ação independente da P-selectina.

A atividade antimetastática da LABH não se restringe a células LLC. De fato, houve efeito antimetastático também em ensaios com células B16F10. O grupo tratado com LABH apresentou menor incidência de metástases ( $p < 0,05$ ) com dose única a partir de 4mg/kg, com expressiva redução de metástases em doses de 20mg/kg. Animais C57Bl/6 WT que receberam essa dose de LABH apresentaram uma tendência de menor número de focos metastáticos que animais C57Bl/6 WT tratados

com HNF suína na dose de 8mg/kg e também animais C57Bl/6 P-selectina<sup>(-/-)</sup> controles. Também nestes ensaios os animais P-selectina<sup>(-/-)</sup> tratados com LABH apresentaram menor incidência de metástases do que o grupo controle P-selectina<sup>(-/-)</sup>. Essa diferença se tornou significativa ( $p < 0,05$ ) ao se analisarem esses dois grupos em separado. Estes resultados apontam na mesma direção que os ensaios com LLC, na medida em que evidenciam atividade antimetastática da LABH e sugerem um efeito incremental nos animais P-selectina<sup>(-/-)</sup>, o que aponta para possíveis mecanismos de ação da LABH independentes da P-selectina. O uso de LABH também demonstrou segurança nesses experimentos.

Nesses ensaios a LABH apresentou benefício na maioria desses desfechos sendo muitas vezes mais efetiva e mais segura que glicosaminoglicanos sabidamente antimetastáticos. Cabe ressaltar que a LABH se apresentou mais segura que a HNF suína, pois expressou menor potencial hemorrágico no ensaio de sangramento, menor letalidade e menos complicações hemorrágicas nos ensaios de crescimento tumoral.

Estas evidências sugerem que a LABH apresenta um potencial benefício no tratamento oncológico a ser explorado na medida em que reduz morbiletalidade nestes modelos experimentais, expressando atividade antimetastática e antitumoral nas doses testadas. Além disso, dentre as formulações de heparina testadas foi a que evidenciou o melhor perfil de eficácia e de segurança.

Estes dados pioneiros na exploração em cenário pré-clínico da LABH descortinam um novo horizonte de estudos exploratórios de moléculas derivadas de heparina bovina com baixa atividade anticoagulante por meio de um processo reprodutível e escalável. Deve-se sublinhar que este estudo teve como objetivo principal investigar a existência de efeito antimetastático e antitumoral da LABH sem, contudo, se debruçar *a priori* nos prováveis mecanismos biológicos da molécula. Estes resultados encorajam ensaios subsequentes com vistas a melhor elucidar os mecanismos de ação da LABH e a explorar seus efeitos biológicos em outros cenários oncológicos experimentais com a perspectiva de ensaios clínicos vindouros. Deste modo, continuaremos avançando nas pesquisas para o incremento do arsenal onco-terapêutico

#### **4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

O modelo de crescimento tumoral estendido não produziu metástases espontâneas pulmonares em nenhum grupo. Deste modo, a atividade antimetastática foi evidenciada apenas em modelos de metástase induzida. Esses modelos não mimetizam todos os mecanismos envolvidos no processo de metástases, como exemplo as mudanças fenotípicas presentes na transição epitélio-mesenquimal, ou a liberação de microvesículas pelo tumor primário que fomentam a instalação de células neoplásicas no sítio secundário.

Além disso, não foram utilizados esquemas de duas ou mais doses diárias. Sob a luz da identificação de uma meia-vida da LABH um pouco menor que 1h, conjectura-se que o uso de doses plurais poderia expor o tumor primário ou os tumores metastáticos por mais tempo à LABH e, desta forma, conceber maior efeito antineoplásico.

Cabe realçar que em alguns desfechos houve tendência de efeito favorável ao grupo tratado com LABH, sem, contudo, alcançar significância estatística. Esse fenômeno pode ser reflexo do N que, na tónica de ensaios exploratórios de modelos animais esbarra em limitações.

#### **5 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Diante do exposto, é de profundo interesse analisar os tumores primários e as metástases pulmonares a partir da óptica das possíveis alterações da microarquitetura tumoral promovidas pela LABH. A avaliação de elementos como grau de invasão plaquetária e leucocitária, do grau de multiplicação celular, da angiogênese e da transição epitélio-mesenquimal podem apontar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antimetastática.

Outrossim, faz-se importante investigar os efeitos antitumoral e antimetastático empregando-se tipos celulares ainda não testados, como B16F10, no caso de modelo de crescimento tumoral, ou de MC38 para ambos os modelos. Ainda, a implementação de um ou mais modelos de metástase espontânea contribuirá para a investigação desses efeitos na medida em que emula com maior verossimilhança os fenômenos fisiopatológicos.

Por fim, será profícua a exploração da maior potencialidade profilática e terapêutica da LABH empregando esquemas com doses maiores, bem como de múltiplas doses ao dia.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Abildgaard U. Highly purified antithrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968. 21, 89–90.
2. Ahmad S, Ansari AA. Therapeutic roles of heparin anticoagulants in cancer and related disorders. *Med Chem.* 2011 Sep;7(5):504-17. doi: 10.2174/157340611796799104. PMID: 21801147
3. Aitokallio-Tallberg AM, Viinikka LU, Ylikorkala RO. Increased synthesis of prostacyclin and thromboxane in human ovarian malignancy. *Cancer Res.* 1988, 48, 2396–2398.
4. Atallah J, Khachfe HH, Berro J, Assi HI. The use of heparin and heparin-like molecules in cancer treatment: a review. *Cancer Treat Res Commun.* 2020;24:100192. doi: 10.1016/j.ctarc.2020.100192. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32673846.
5. Borsig L. Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them. *Physiology* 2004, 19, 16–21; <https://doi.org/10.1152/nips.01450.2003>.
6. Borsig L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb Res.* 2010 Apr;125 Suppl 2:S66-71. doi: 10.1016/S0049-3848(10)70017-7. PMID: 20434009.
7. Borsig L. Heparin as an inhibitor of cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010;93:335-49. doi: 10.1016/S1877-1173(10)93014-7. PMID: 20807651.
8. Brazilian Pharmacopoeia. 6 th Ed. Vol. II – monographs. Biological products. Brasília: ANVISA 2019.
9. Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin, *Am. J. Physiol* 1939.125, 683–687
10. Cassinelli G, Torri G, Naggi A. Non-Anticoagulant Heparins as Heparanase Inhibitors. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:493-522. doi: 10.1007/978-3-030-34521-1\_20. PMID: 32274724; PMCID: PMC7142274.
11. Castelli R, Porro F, Tarsia P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med.* 2004 May;9(3):205-13. doi: 10.1191/1358863x04vm566ra. PMID: 15675186.
12. Castellot JJ Jr, Wong K, Herman B, Hoover RL, Albertini DF, Wright TC, Caleb BL, Karnovsky MJ. 1985. Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 124:13–20.

13. Castellot JJ Jr, Pukac LA, Caleb BL, Wright TC Jr, Karnovsky MJ. 1989. Heparin selectively inhibits a protein kinase C–dependent mechanism of cell cycle progression in calf aortic smooth muscle cells. *J Cell Biol* 109:3147–3155, (published erratum appears in *J Cell Biol* 110:863).
14. Colin S, Jeanny JC, Mascarelli F, Vienet R, Al-Mahmood S, Courtois Y, Labarre J. In vivo involvement of heparan sulfate proteoglycan in the bioavailability, internalization, and catabolism of exogenous basic fibroblast growth factor. *Mol Pharmacol*. 1999 Jan;55(1):74-82. doi: 10.1124/mol.55.1.74. PMID: 9882700.
15. Coupland LA, Chong BH, Parish CR. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Res*. 2012 Sep 15;72(18):4662-71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4010. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22836751.
16. Da Silva MS, Horton JA, Wijelath JM, Blystone LW, Fish WR, Wijelath E, Strand K, Blystone SD, Sobel M. Heparin modulates integrin-mediated cellular adhesion: specificity of interactions with alpha and beta integrin subunits. *Cell Commun Adhes*. 2003 Mar-Apr;10(2):59-67. PMID: 14681057.
17. Damus PS, Hicks M, Rosenberg RD. Anticoagulant action of heparin, *Nature* 1973. 246, 355–357.
18. Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b=CD1). *J Cell Biol* 1995; 130: 1473-82.
19. Djaafar S, Dunand-Sautier I, Gonelle-Gispert C, Lacotte S, DE Agostini A, Petro M, Rubbia-Brandt L, Morel P, Toso C, Mentha G. Enoxaparin Attenuates Mouse Colon Cancer Liver Metastases by Inhibiting Heparanase and Interferon- $\gamma$ -inducible Chemokines. *Anticancer Res*. 2016 Aug;36(8):4019-32. PMID: 27466508.
20. Dovizio M, Maier TJ, Alberti S, Di Francesco L, Marcantoni E, Münch G, John CM, Suess B, Sgambato A, Steinhilber D, Patrignani P. Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 2013 Jul;84(1):25-40. doi: 10.1124/mol.113.084988. Epub 2013 Apr 11. PMID: 23580446.
21. Ek L, Gezelius E, Bergman B, Bendahl PO, Anderson H, Sundberg J, Wallberg M, Falkmer U, Verma S, Belting M; Swedish Lung Cancer Study Group (SLUSG). Randomized phase III trial of low-molecular-weight heparin enoxaparin in addition to standard treatment in small-cell lung cancer: the RASTEN trial. *Ann Oncol*. 2018 Feb 1;29(2):398-404. doi: 10.1093/annonc/mdx716. PMID: 29106448; PMCID: PMC5834130.
22. Fabricius HÅ, Starzonek S, Lange T. The Role of Platelet Cell Surface P-Selectin for the Direct Platelet-Tumor Cell Contact During Metastasis Formation in Human Tumors. *Front Oncol*. 2021 Mar 15;11:642761. doi: 10.3389/fonc.2021.642761. PMID: 33791226; PMCID: PMC8006306.
23. Glauser BF, Vairo BC, Oliveira CP, Cinelli LP, Pereira MS, Mourão PA. Generic versions of enoxaparin available for clinical use in Brazil are

- similar to the original drug. *J Thromb Haemost.* 2011 Jul;9(7):1419-22. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04330.x. PMID: 21535394.
24. Gupta N, Zhao YY, Evans CE. The stimulation of thrombosis by hypoxia. *Thromb Res.* 2019 Sep;181:77-83. doi: 10.1016/j.thromres.2019.07.013. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31376606.
  25. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med.* 2000 Mar 27;160(6):809-15. doi: 10.1001/archinte.160.6.809. PMID: 10737280.
  26. Hemker HC. A century of heparin: past, present and future. *J Thromb Haemost.* 2016 Dec;14(12):2329-2338. doi: 10.1111/jth.13555. Epub 2016 Dec 16. PMID: 27862941.
  27. Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodaysky I, Borsig L. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J.* 2007 Nov;21(13):3562-72. doi: 10.1096/fj.07-8450com. Epub 2007 Jun 8. PMID: 17557930.
  28. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, Thachil J, van der Poll T, Levi M; Scientific and Standardization Committee on DIC, and the Scientific and Standardization Committee on Perioperative and Critical Care of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost.* 2019 Nov;17(11):1989-1994. doi: 10.1111/jth.14578. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31410983.
  29. Kandrotas, RJ. Heparin Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics* 1992. 22(5), 359–374. doi:10.2165/00003088-199222050-00003
  30. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer.* 2007 Nov 15;110(10):2339-46. doi: 10.1002/cncr.23062. PMID: 17918266.
  31. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* 1998; 101: 877-89.
  32. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7775-83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2123. Epub 2009 Sep 8. PMID: 19738039.
  33. Kragh M, Binderup L, Vig Hjarnaa PJ, Bramm E, Johansen KB, Frimundt Petersen C. Non-anti-coagulant heparin inhibits metastasis but not primary tumor growth. *Oncol Rep.* 2005 Jul;14(1):99-104. PMID: 15944775.
  34. Kumar R, Kuniyasu H, Bucana CD, Wilson MR, Fidler IJ. Spatial and temporal expression of angiogenic molecules during tumor growth and progression. *Oncol Res* 1998; 10: 3011

35. Lazo-Langner A, Goss GD, Spaans JN, Rodger MA. The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost.* 2007 Apr;5(4):729-37. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02427.x. PMID: 17408406.
36. Lee AY, Rickles FR, Julian JA, Gent M, Baker RI, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, Levine MN. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1;23(10):2123-9. doi: 10.1200/JCO.2005.03.133. Epub 2005 Feb 7. PMID: 15699480.
37. Lepri A, Benelli U, Bernardini N, Bianchi F, Lupetti M, Danesi R, Del Tacca M, Nardi M. Effect of low molecular weight heparan sulphate on angiogenesis in the rat cornea after chemical cauterization. *J Ocul Pharmacol.* 1994 Spring;10(1):273-80. doi: 10.1089/jop.1994.10.273. PMID: 8207330.
38. Lever R, Mulloy B, Page C. Heparin - A Century of Progress. *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 207. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. Pp. 3-22,185. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23056-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23056-1_12).
39. Liu J, Xie J, Huang Y, Xie J, Yan X. TFPI-2 inhibits the invasion and metastasis of bladder cancer cells. *Prog Urol.* 2021 Feb;31(2):71-77. doi: 10.1016/j.purol.2020.07.243. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32891505.
40. Lyon M, Rushton G, Gallagher JT. The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem.* 1997 Jul 18;272(29):18000-6. doi: 10.1074/jbc.272.29.18000. PMID: 9218427.
41. Ludwig RJ. Therapeutic use of heparin beyond anticoagulation. *Curr Drug Discov Technol.* 2009 Dec;6(4):281-9. doi: 10.2174/157016309789869001. PMID: 20025596.
42. Ma SN, Mao ZX, Wu Y, Liang MX, Wang DD, Chen X, Chang PA, Zhang W, Tang JH. The anti-cancer properties of heparin and its derivatives: a review and prospect. *Cell Adh Migr.* 2020 Dec;14(1):118-128. doi: 10.1080/19336918.2020.1767489. PMID: 32538273; PMCID: PMC7513850.
43. Macbeth F, Noble S, Evans J, Ahmed S, Cohen D, Hood K, Knoyle D, Linnane S, Longo M, Moore B, Woll PJ, Appel W, Dickson J, Ferry D, Brammer C, Griffiths G. Randomized Phase III Trial of Standard Therapy Plus Low Molecular Weight Heparin in Patients With Lung Cancer: FRAGMENT Trial. *J Clin Oncol.* 2016 Feb 10;34(5):488-94. doi: 10.1200/JCO.2015.64.0268. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26700124.
44. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, De Arcangelis A, Abrams SI, Orend G, Gachet C, Mangin PH. Platelet integrin  $\alpha 6\beta 1$  controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight.* 2016 Sep 8;1(14):e88245. doi: 10.1172/jci.insight.88245. PMID: 27699237; PMCID: PMC5033851.
45. Mattsson CH, Palm M, Soderberg K, Holmer E. Antithrombotic effects of heparin oligosaccharides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989. 556: 323-332.

46. McLean J. The thromboplastic action of cephalin, *Am. J. Physiol* 1916. 41, 250–257.
47. Mishra-Gorur K, Castellot JJ Jr. Heparin rapidly and selectively regulates protein tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1999; 178: 205-15.
48. Monkhouse FC, France ES, Seegers WH. Studies on the antithrombin and heparin cofactor activities of a fraction absorbed from plasma by aluminium hydroxide, *Circ. Res.* 1955, 3, 397–402.
49. Negri EM, Piloto BM, Morinaga LK, Jardim CVP, Lamy SAE, Ferreira MA, D'Amico EA, Deheinzelin D. Heparin Therapy Improving Hypoxia in COVID-19 Patients - A Case Series. *Front Physiol.* 2020 Oct 19;11:573044. doi: 10.3389/fphys.2020.573044. PMID: 33192569; PMCID: PMC7604350.
50. Nevo N, Ghanem S, Crispel Y, Tatour M, Cohen H, Kogan I, Ben-Arush M, Nadir Y. Heparanase Level in the Microcirculation as a Possible Modulator of the Metastatic Process. *Am J Pathol.* 2019 Aug;189(8):1654-1663. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.04.019. Epub 2019 May 23. PMID: 31128083.
51. Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Büller HR, Reitsma PH, Richel DJ. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Mar;61(3):195-207. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.007. Epub 2006 Oct 30. PMID: 17074500.
52. Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST. Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016 Jul 4;9(3):38. doi: 10.3390/ph9030038. PMID: 27384570; PMCID: PMC5039491.
53. Oliveira SN, Santos GR, Glauser BF, et al. Structural and functional analyses of biosimilar enoxaparins available in Brazil. *Thromb Haemost* 2015;113(01):53–65.
54. Ong CS, Marcum JA, Zehr KJ, Cameron DE. A Century of Heparin. *Ann Thorac Surg.* 2019 Sep;108(3):955-958. doi: 10.1016/j.athoracsur.2019.03.104. Epub 2019 May 8. PMID: 31077659.
55. Onishi A, St Ange K, Dordick JS, Linhardt RJ. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2016 Jun 1;21(7):1372-92. doi: 10.2741/4462. PMID: 27100512.
56. Ottlinger ME, Pukac LA, Karnovsky MJ. 1993. Heparin inhibits mitogen-activated protein kinase activation in intact rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268:19173–19176.
57. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, Salih HR. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 2012 Jan 15;72(2):440-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1872. Epub 2011 Nov 29. PMID: 22127925.
58. Ponert JM, Gockel LM, Henze S, Schlesinger M. Unfractionated and Low Molecular Weight Heparin Reduce Platelet Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic and Prostate Cancer Cells.

- Molecules. 2018 Oct 19;23(10):2690. doi: 10.3390/molecules23102690. PMID: 30347648; PMCID: PMC6222876.
59. Pukac LA, Castellot JJ Jr, Wright TC Jr, Caleb BL, Karnovsky MJ. 1990. Heparin inhibits c-fos and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Cell Regul* 1:435–443.
60. Rider CC, Mulloy B. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- $\beta$  Cytokine Superfamily. *Molecules*. 2017 Apr 29;22(5):713. doi: 10.3390/molecules22050713. PMID: 28468283; PMCID: PMC6154108.
61. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J Hematol Oncol*. 2018 Oct 11;11(1):125. doi: 10.1186/s13045-018-0669-2. PMID: 30305116; PMCID: PMC6180572.
62. Santos RP, Tovar AMF, Oliveira MR, Piquet AA, Capillé NV, Oliveira SNMCG, Correia AH, Farias JN, Vilanova E, Mourão PAS. Pharmacokinetic, Hemostatic, and Anticancer Properties of a Low-Anticoagulant Bovine Heparin. *TH Open*. 2022 May 26;6(2):e114-e123. doi: 10.1055/s-0042-1745743. PMID: 35707626; PMCID: PMC9135479.
63. Schwarz S, Gockel LM, Naggi A, Barash U, Gobec M, Bendas G, Schlesinger M. Glycosaminoglycans as Tools to Decipher the Platelet Tumor Cell Interaction: A Focus on P-Selectin. *Molecules*. 2020 Feb 26;25(5):1039. doi: 10.3390/molecules25051039. PMID: 32110917; PMCID: PMC7179249.
64. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*. 1986 Nov;46(11):5629-32. PMID: 3756910.
65. Soker S, Goldstaub D, Svahn CM, Vlodaysky I, Levi BZ, Neufeld G. Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Sep 15;203(2):1339-47. doi: 10.1006/bbrc.1994.2329. PMID: 7522446.
66. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 1;11(19 Pt 1):7003-11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1131. PMID: 16203794.
67. Tang N, Bai H, Chen X, Gong J, Li D, Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*. 2020 May;18(5):1094-1099. doi: 10.1111/jth.14817. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32220112.
68. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020 Apr;18(4):844-847. doi: 10.1111/jth.14768. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32073213; PMCID: PMC7166509.
69. Tovar AMF, Vairo BC, Oliveira SMCG, Glauser BF, Santos GRC, Capillé NV, Piquet AA, Santana PS, Micheli KVA, Pereira MS, Vilanova E, Mourão PAS. Converting the Distinct Heparins Sourced from Bovine or Porcine

- Mucosa into a Single Anticoagulant Drug. *Thromb Haemost.* 2019 Apr;119(4):618-632. doi: 10.1055/s-0039-1678663. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30791055.
70. Verstraete M. Pharmacotherapeutic aspects of unfractionated and low molecular weight heparins. *Drugs.* 1990 Oct;40(4):498-530. doi: 10.2165/00003495-199040040-00003. PMID: 1964634.
71. Vilanova E, Glauser BF, Oliveira SM, Tovar AM, Mourão PA. Update on Brazilian biosimilar enoxaparins. *Expert Rev Hematol.* 2016 Nov;9(11):1015-1021. doi: 10.1080/17474086.2016.1243052. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27680213.
72. Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y, Brenner B, Katz BZ, Naggi A, Torri G, Casu B, Sasisekharan R. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 2:S112-20. doi: 10.1016/S0049-3848(07)70139-1. Erratum in: *Thromb Res.* 2008;123(1):187-90. PMID: 18023704.
73. Waugh DF, Fitzgerald MA. Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma. *Am. J. Physiol* 1956. 184, 627–639.
74. Wolf H. Low-molecular-weight heparin. *Med Clin North Am.* 1994 May;78(3):733-43. doi: 10.1016/s0025-7125(16)30155-9. PMID: 8170267.
75. World Health Organization, acessado em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> em 6 de novembro de 2022.
76. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, Dedhar S, Derynck R, Ford HL, Fuxe J, García de Herreros A, Goodall GJ, Hadjantonakis AK, Huang RYJ, Kalcheim C, Kalluri R, Kang Y, Khew-Goodall Y, Levine H, Liu J, Longmore GD, Mani SA, Massagué J, Mayor R, McClay D, Mostov KE, Newgreen DF, Nieto MA, Puisieux A, Runyan R, Savagner P, Stanger B, Stemmler MP, Takahashi Y, Takeichi M, Thevenneau E, Thiery JP, Thompson EW, Weinberg RA, Williams ED, Xing J, Zhou BP, Sheng G; EMT International Association (EMTIA). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jun;21(6):341-352. doi: 10.1038/s41580-020-0237-9. Epub 2020 Apr 16. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Dec;22(12):834. PMID: 32300252; PMCID: PMC7250738.
77. Yoshitomi Y, Nakanishi H, Kusano Y, Munesue S, Oguri K, Tatematsu M, Yamashina I, Okayama M. Inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically modified heparin with reduced anticoagulant activity. *Cancer Lett.* 2004 Apr 30;207(2):165-74. doi: 10.1016/j.canlet.2003.11.037. PMID: 15072825.
78. Yuanhong L, Lixun P, Muxun Z. et al. Effects of heparin on transforming growth factor- $\beta$ 1 and extracellular matrix components in the glomeruli of diabetic rats. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 2003. 23, 10–12. <https://doi.org/10.1007/BF02829449>
79. Yu Y, Lv Q, Zhang B, Lan F, Dai Y. Adjuvant therapy with heparin in patients with lung cancer without indication for anticoagulants: A systematic review of the literature with meta-analysis. *J Cancer Res Ther.*

2016 Oct;12(Supplement):37-42. doi: 10.4103/0973-1482.191627. PMID: 27721250.

80. Zhang C, Liu Y, Gao Y, Shen J, Zheng S, Wei M, Zeng X. Modified heparins inhibit integrin alpha(IIb)beta(3) mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2009 Nov 1;125(9):2058-65. doi: 10.1002/ijc.24561. PMID: 19598263.
81. Zucchella M, Dezza L, Pacchiarini L, Meloni F, Tacconi F, Bonomi E, Grignani G, Notario A. Human tumor cells cultured "in vitro" activate platelet function by producing ADP or thrombin. *Haematologica*. 1989 Nov-Dec;74(6):541-5. PMID: 2628235.

## ANEXO 1