



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**EVALUACIÓN *in vivo* DE LA ACTIVIDAD  
ANTICOAGULANTE DE POLISACÁRIDOS  
SULFATADOS EXTRAÍDOS DEL ALGA  
*Macrocystis pyrifera***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**ELENA STEPHANIE CASTRO SILVA**

**LA PAZ, B.C.S., JUNIO DEL 2013**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de Mayo del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"EVALUACIÓN *in vivo* DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE  
POLISACÁRIDOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DEL ALGA *Macrocystis pyrifera*"**

Presentada por el alumno:

**CASTRO**  
Apellido paterno

**SILVA**  
materno

**ELENA STEPHANIE**  
nombre(s)

Con registro: 

A	1	1	0	4	4	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

\_\_\_\_\_  
**DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ**  
Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
**DR. AMAURY CORBERO TAPIA**  
2º Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
**DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA**

\_\_\_\_\_  
**DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ**

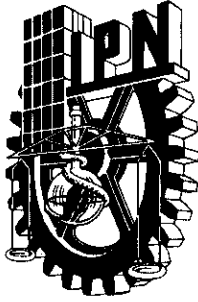
\_\_\_\_\_  
**DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA**

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ**



**IPN  
CICIMAR  
DIRECCION**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 13 del mes Junio del año 2013  
el (la) que suscribe BM. ELENA STEPHANIE CASTRO SILVA alumno(a) del  
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS  
con número de registro A110445 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ Y DR. AMAURY CORDERO TAPIA  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN *in vivo* DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE  
POLISACÁRIDOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DEL ALGA *Macrocystis pyrifera*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: pele\_sd100@hotmail.com - jimurillo2003@yahoo.com - acordero@cibnor.mx  
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

*Elena Stephanie Castro Silva*

BM. ELENA STEPHANIE CASTRO SILVA

*nombre y firma*

## **Dedicatoria.**

Al amor,  
que es el amor si no, la fuente de inspiración y la energía que mueve hasta el corazón mas errante.

Es mucho pedir desde aquí,  
que siga siendo usted uno de mis sueños:  
Presente, pasado,  
y futuro si no se aleja.

Con los hoyuelos de su sonrisa,  
las barbas crecidas  
sus ojos, esos ópalos remolinados  
con el ayer y el hoy.

Es mucho pedir que siga ahí  
fumándose mis palabras  
con el aroma que más le gusta.  
Y mis añejos versos  
mueran con el vino de su boca.

Gracias por ser: amor,  
amor y mas mi amor.  
Le amo y no lo sabe.  
O quizá sí y lo olvida a veces,  
cuando se le cierra el mundo.

Es mucho pedir que se quede,  
no me ignore.  
Que sonría y sea aquí,  
mío y no.  
Apasionado y no.

Y entre tantas cosas que pudieron sucederme,  
en la piel,  
la mente y todo;  
¡Usted!  
la mejor.

## Agradecimientos

A mi toda familia, principalmente a mi madre Clara Silva por su apoyo y comprensión, a mi padre Miguel Castro por sus consejos; también a mis hermanas Paola y Yulissa Cota Silva por aguantar mis malos ratos de estrés y hacerme sonreír ¡Las amo!

A mis preciosas Fernanda y Yazkara por su atención, aliento y apoyo incondicional en todo y siempre; a Fernando Oliver por cuidar y querer a mi Fer y siempre brindar su apoyo y amistad. A mi flaca hermosa Cynthia por escucharme y aguantar mis rabietas aun en la lejanía, por ayudarme y estar conmigo.

A Mario por su paciencia, amor y comprensión en todo momento así como a su hermosa familia que me ha abierto las puertas de su casa con cariño.

Mis queridos amigos(as) y compañeros (as) de cubículo y clases: Adriana, Diego (pony), Jatziry, Mónica, Patsy, Victor, Sonia, Alfredo, Carlos, Mirsha y especialmente a Armando, porque sin su buen humor, alegría y amistad no hubiese disfrutado tanto. A mis queridos amigos, Sergio (Mi hijo), Juan Manuel (Hacker), Shelley, Gilberto, Natalia, Rocío, Burnes, Ricardo, Sonia, Itzel, Jeannette, Lorena, etc. que en su momento me regalaron palabras de aliento y apoyo así como buenos recuerdos generados en todo este tiempo compartido.

A mis asesores, Dr. Iván Murillo Álvarez, M.C. Mauricio Muñoz Ochoa y Dr. Amaury Cordero por toda su ayuda, paciencia y comprensión que me han brindado.. ¡sobre todo por aguantarme!

A mis compañeros en el Laboratorio de Química de Algas Marinas CICIMAR, M.C. Elizabeth Rodríguez, M.C. Dora Arvizu, Dr. Gustavo Carmona por toda su ayuda y paciencia; a Bernardo, Araceli, Miguel, Valeria, Ana, Valerie por ayudarme en el laboratorio y su compañía.

A mis alumnos del Colegio California que gracias a ellos los días difíciles se tiñeron de buen humor y alegría; a mis bebes Cirilo y Cuca, por ser mis compañeros nocturnos, mañaneros y vespertinos; sobre todo amigos taciturnos.

Al Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por prestar sus instalaciones para llevar a cabo todo el proceso de experimentación, así también a CONACYT, sistemas de beca PIFI y proyectos SIP por proporcionar los fondos de donde se deriva el presente trabajo.

A los que han creído en mí, que me han dado palabras de aliento en los momentos que me sentí flaquear, a los que han compartido conmigo y he olvidado mencionar.. ¡Muchas gracias!

## Índice

	Página
Índice de imágenes.....	v
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	viii
Lista de abreviaciones.....	ix
Glosario.....	x
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Mecanismo de coagulación sanguínea.....	3
2.2. Las algas marinas y su actividad anticoagulante.....	5
2.3. Uso del modelo de ratón en la investigación.....	10
2.4. Descripción de los órganos sanos en ratón.....	11
3. Justificación.....	18
3.1. Hipótesis.....	19
4. Objetivo general.....	19
4.1. Objetivos particulares.....	19
5. Material y método.....	20
5.1. Colecta del material algal.....	20
5.2. Obtención de los extractos, purificación y caracterización.....	21
5.3. Pruebas de actividad anticoagulante <i>in vitro</i> .....	21
5.4. Actividad anticoagulante <i>in vivo</i> .....	22
5.4.1. Determinación de dosis.....	22
5.4.2. Soluciones inyectables.....	22
5.4.3. Ensayos <i>in vivo</i> .....	22
5.5. Análisis hematológico.....	23
5.6. Análisis histológico.....	24
6. Resultados.....	24
6.1 Obtención del extracto acuoso, precipitación fraccionada los polisacáridos sulfatados y pruebas <i>in vitro</i> .....	24
6.2. Caracterización de química de los polisacáridos sulfatados.....	27
6.3. Análisis hematológicos.....	29
6.4. Aspectos físicos y morfológicos.....	31
6.5. Análisis histológicos.....	31
7. Discusión.....	41
7.1 Actividad anticoagulante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> y conformación estructural..	41
7.2. Análisis hematológico e histológico.....	46
8. Conclusiones .....	50

9. Recomendaciones.....	51
10. Bibliografía citada.....	52
11. Anexos.....	59
Anexo 1. Calendario de inoculación.....	59
Anexo 2. Parámetros y metodologías usadas en el análisis de sangre total, plasma y suero de ratón.....	60
Anexo 3. Datos con el promedio $\pm$ SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de protrombina (TP) en hembras <i>in vivo</i> .....	61
Anexo 4. Datos con el promedio $\pm$ SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de protrombina (TP) en machos <i>in vivo</i> .....	62
Anexo 5. Datos con el promedio $\pm$ SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) en hembras <i>in vivo</i> ....	62
Anexo 6. Datos con el promedio $\pm$ SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) en machos <i>in vivo</i> .....	63
Anexo 7. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento 5 mg/kg con la fracción 06-019-61 F1A. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.....	64
Anexo 8. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento 2 mg/kg con la fracción 06-019-61 F1A. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012...	67
Anexo 9. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento con 0.5 mg/kg de la fracción 06-019-61 F1A. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012...	70
Anexo 10. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento con 2 mg/kg de heparina sódica. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.....	73
Anexo 11. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del grupo al que se inyectó solución salina (0.9% NaCl). Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012...	76

## Índice de imágenes

	Página
Imagen 1. Anatomía de los órganos del ratón <i>Mus musculus</i> .....	12
Imagen 2. Ilustración del corazón donde se observa el ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI) y el septo interventricular (SI).....	12
Imagen 3. Se observa tejido de pulmón.....	13
Imagen 4. Se observa tejido de hígado, donde la imagen A muestra con flechas las triadas portales; en la imagen B se visualiza la región portal con hepatocitos (H), conducto biliar (Cb) y vena central (V).....	14
Imagen 5. Se observan diferentes cortes histológicos de tejido de riñón. La imagen A es el corte longitudinal de riñón, donde se observa corteza (C), médula (M), papila (P) y capsula (Cp); en la imagen B se observa la estructura glomerular (G) rodeada por túbulos distales y en la imagen C también se observa un glomérulo (G), túbulos contorneados distales (flechas rojas) y proximales (flechas negras).....	15
Imagen 6. Pulpa blanca (PB), pulpa roja (PR), capsula (C).....	16
Imagen 7. Se observa el corte longitudinal del fémur con tejido muscular (TM), médula ósea (MO), cartílago en crecimiento (C).....	17
Imagen 8. Mapa que muestra en color rojo el área dónde se obtuvo <i>Macrocystis pyrifer</i> .....	20
Imagen 9. Se observa la imagen ampliada A en objetivo 40x, donde la flecha de color negro muestra los eritrocitos e infección bacteriana en ventrículo del corazón, es una muestra de ratón macho inoculado con 5mg/kg de 06-019-61 F1A. En la imagen B se observa el septo interventricular (SI) y el ventrículo (V) a objetivo 4x. En la imagen C se observa inserción de grasa en pericardio y tejido conectivo. En la imagen D también se observa inserción de grasa en tejido conectivo. Ambas muestras pertenecen a hembras tratadas con 5mg/kg de 06-019-61 F1A. Las imágenes se obtuvieron a 40X.....	33
Imagen 10. Las flechas de la imagen A muestran el citoplasma vacuolizado en hepatocitos de ratón hembra, a la cual se aplicó el tratamiento de 2mg/kg de 06-019-61 F1A; en la imagen B se visualiza los hepatocitos del ratón hembra con tratamiento de 0.5mg/kg de 06-019-61 F1A. Es clara la deformidad de las células (anisocitosis y anisocariosis). En la imagen C la flecha roja indica la vena central con hiperplasia, esta es una muestra obtenida de hembra a la que se inoculó con solución salina. En la imagen D de igual manera se observa hiperplasia en una muestra de macho al que se inyectó 5 mg/kg de 06-019-61 F1A. Todas las	



imágenes se obtuvieron a 40x.....	34
Imagen 11. Se observan glomérulos dilatados en la imagen A (flechas rojas) y túbulos proximales deformados en el riñón (flechas negras); la muestra se obtuvo de ratón hembra tratado con 5mg/kg de 06-019-61 F1A; de igual manera se observan los glomérulos del ratón macho con el mismo tratamiento (imagen B). En la imagen C se observa hiperplasia alrededor del glomérulo en riñón, obtenido de ratón hembra tratada con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A.....	35
Imagen 12. la imagen A muestra hiperplasia entre los tubulos proximales y distales. La imagen B muestra inserción grasa en papila de hembra tratada con 2 mg/kg de heparina sódica y en la imagen C se observa vacuolizacion en citoplasma de los tubulos colectores (papila), en una muestra de macho tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A. Las imágenes se obtuvieron en 4 y 40x respectivamente.....	36
Imagen 13. Las flechas rojas de la imagen A muestran aumento sanguíneo en las venas del pulmón y el tejido proviene del raton hembra del tratamiento de 5mg/kg de 06-019-61-F1A; en la figura B se observan hemosiderina y eritrocitos en los alveolos, el tejido proveniente del raton macho con el mismo tratamiento. Las imágenes se obtuvieron a 40 y 100x respectivamente. En la imagen C se observa insercion grasa en pulmon de hembra tratada con 5mg/kg de 06-019-61 F1A (40x).....	37
Imagen 14. Se observa infiltración grasa en tejido de raton macho tratado con 2 mg/kg de heparina (10x) en la imagen A. En la imagen B la flecha indica la infiltración bateriana en vena de pulmón macho que fue tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A y al igual que la imagen C se observa hiperplasia (flechas rojas). Las imágenes se obtuvieron a 10 y 40 X.....	38
Imagen 15. Se visualizó hemosiderina y eritrocitos fagocitados en el bazo del ratón hembra al que se le aplicó el tratamiento de 5mg/kg de 06-019-61 F1A (imagen A) y macrófagos (flecha negra). De igual manera se observan hemosiderina y eritrocitos destruidos en la imagen B proveniente del ratón macho con el mismo tratamiento. Las imágenes se obtuvieron a 40 y 10x respetivamente. En la figura C se observainfiltracion grasa en medula osea de hembra tratada con 5 mg/kg de 06-019-61 F1A y en la figura D se observa médula osea de ratón macho al que se aplico 2mg/kg de heparina sodica. Ambas imágenes se obtuvieron a 10x.....	39

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Representación de la cascada de coagulación.....	5
Figura 2. Estructura química del fucoidan.....	6
Figura 3. Diagrama de la extracción donde se muestran las fracciones obtenidas de <i>M. pyrifera</i> , así como los tiempos de coagulación sanguínea por el análisis de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos.....	25
Figura 4. Se muestra el tiempo en segundos de la inhibición en la formación del coágulo sanguíneo en el ensayo de TP. La fracción 06-019-61 F1A presentó el mayor tiempo con 183.9 segundos.....	26
Figura 5. Se muestra el tiempo en segundos de la inhibición en la formación del coagulo, sanguíneo en el ensayo TTPa con plasma sanguíneo de hembras. La fracción 06-019-61 F1A fue mayor con 183.9 segundos.....	26
Figura 6. Se muestra el tiempo en segundos de la inhibición en la formación del coagulo, sanguíneo en el ensayo TTPa utilizando plasma sanguíneo de machos. La fracción 06-019-61 F1A fue mayor con 183.9 segundos.....	27
Figura 7. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup> H de la fracción 06-019-61 F1A.....	28
Figura 8. Espectro de infrarrojo de la fracción 06-019-61 F1A.....	29
Imagen 9. Se observa la imagen ampliada A en objetivo 40x, donde la flecha de color negro muestra los eritrocitos e infección bacteriana en ventrículo del corazón, es una muestra de ratón macho inoculado con 5mg/kg de 06-019-61 F1A. En la imagen B se observa el septo interventricular (SI) y el ventrículo (V) a objetivo 4x. En la imagen C se observa insercion grasa en pericardio y tejido conectivo. En la imagen D tambien se observa insercion grasa en tejido conectivo. Ambas muestras pertenecen a hembras tratadas con 5mg/kg de 06-019-61 F1A. Las imágenes se obtuvieron a 40X.....	33
Imagen 10. Las flechas de la imagen A muestran el citoplasma vacuolizado en hepatocitos de raton hembra, a la cual se aplicó el tratamiento de 2mg/kg de 06-019-61 F1A; en la imagen B se visualiza los hepatocitos del ratón hembra con tratamiento de 0.5mg/kg de 06-019-61 F1A. Es clara la deformidad de las células (anisocitosis y anisocariosis). En la imagen C la flecha roja indica la vena central con hiperplasia, esta es una muestra obtenida de hembra a la que se inoculó con solucion salina. En la imagen D se de igual manera se observa hiperplasia en una muestra de macho al que se inyecto 5 mg/kg de 06-019-61 F1A. Todas las imágenes se obtuvieron a 40x.....	34
Imagen 11. Se observan glomérulos dilatados en la imagen A (flechas rojas) y túbulos proximales deformados en el riñon (flechas negras); la muestra se obtuvo de raton hembra tratado con 5mg/kg de 06-019-61 F1A; de igual manera se observan los glomérulos del ratón macho con	

el mismo tratamiento (imagen B) . En la imagen C se observa hiperplasia alrededor del glomerulo en riñon, obtenido de raton hembra tratada con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A.....	35
Imagen 12. la imagen A muestra hiperplasia entre los tubulos proximales y distales. La imagen B muestra inserción grasa en papila de hembra tratada con 2 mg/kg de heparina sódica y en la imagen C se observa vacuolizacion en citoplasma de los tubulos colectores (papila), en una muestra de macho tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A. Las imágenes se obtuvieron en 4 y 40x respectivamente.....	36
Imagen 13. Las flechas rojas de la imagen A muestran aumento sanguíneo en las venas del pulmón y el tejido proviene del raton hembra del tratamiento de 5mg/kg de 06-019-61-F1A; en la figura B se observan hemosiderina y eritrocitos en los alveolos, el tejido proveniente del raton macho con el mismo tratamiento. Las imágenes se obtuvieron a 40 y 100x respectivamente. En la imagen C se observa insercion grasa en pulmon de hembra tratada con 5mg/kg de 06-019-61 F1A (40x).....	37
Imagen 14. Se observa infiltración grasa en tejido de raton macho tratado con 2 mg/kg de heparina (10x) en la imagen A. En la imagen B la flecha indica la infiltración bateriana en vena de pulmón macho que fue tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A y al igual que la imagen C se observa hiperplasia (flechas rojas). Las imágenes se obtuvieron a 10 y 40 x.....	38
Imagen 15. Se visualizó hemosiderina y eritrocitos fagocitados en el bazo del ratón hembra al que se le aplicó el tratamiento de 5mg/kg de 06-019-61 F1A (imagen A) y macrófagos (flecha negra). De igual manera se observan hemosiderina y eritrocitos destruidos en la imagen B proveniente del ratón macho con el mismo tratamiento. Las imágenes se obtuvieron a 40 y 10x respetivamente. En la figura C se observainfiltracion grasa en medula osea de hembra tratada con 5 mg/kg de 06-019-61 F1A y en la figura D se observa médula osea de ratón macho al que se aplico 2mg/kg de heparina sodica. Ambas imágenes se obtuvieron a 10x.....	39

#### Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Se observan los valores de la media ( $\bar{X}$ ) obtenidos para cada uno de los parámetros donde se encontró diferencias significativas con el análisis de friedman. Los números señalados en rojo son los valores más altos. También se pueden visualizar los valores de ji cuadrada ( $X^2$ ).....	30

## Lista de abreviaciones

Nm	Nanómetro
Mg	Miligramo
Mm	Milímetro
mL	Mililitro
µm	micrómetro
µL	Microlitro
G	Gramo
Kg	Kilogramo
H <sub>2</sub> O	Agua
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
NaCO <sub>3</sub>	carbonato de sodio
IR	espectrometría de infrarrojo
NMR	resonancia magnética nuclear
SMAC 24	Por sus siglas en inglés: Sequential multiple analysis computed twenty four elements

## Glosario

<b>Albumina:</b>	proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo y se sintetiza en el hígado. Tiene como función en el mantenimiento de la presión osmótica.
<b>Ácido úrico:</b>	compuesto orgánico que contiene carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y es un producto de desecho del metabolismo del nitrógeno.
<b>Basófilos:</b>	células pertenecientes a los leucocitos que miden 10-14 $\mu\text{m}$ y se producen en la médula ósea. Intervienen activamente en la respuesta inmunitaria.
<b>Biometría hemática:</b>	medición de los componentes celulares de la sangre entre los que se encuentra la fórmula roja y fórmula blanca.
<b>Bilirrubina:</b>	Pigmento biliar que tiene una coloración amarilla-naranja y se obtiene de la degradación de hemoglobina.
<b>Bilirrubina directa:</b>	pigmento biliar que se genera cuando la bilirrubina indirecta pasa por el hígado y se conjuga con ácido glucurónico.
<b>Bilirrubina indirecta:</b>	pigmento biliar que se genera cuando los hematíes se degradan y liberan la hemoglobina, que posteriormente es metabolizada en el grupo hemo y grupo globina; el grupo hemo se transforma en biliverdina y en bilirrubina indirecta.
<b>Cociente aterogénico:</b>	proporción matemática que se obtiene entre los niveles de colesterol total en sangre y el colesterol HDL.
<b>Colesterol:</b>	esterol que se encuentra en el plasma sanguíneo y los tejidos de órganos como hígado, médula espinal, páncreas y cerebro.
<b>Colesterol HDL:</b>	lipoproteína de alta densidad que se encarga transportar el colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado.
<b>Colesterol LDL:</b>	lipoproteínas de baja densidad denominado comúnmente "colesterol malo" ya que si circula en grandes cantidades por el torrente sanguíneo puede acumularse en las paredes de las arterias obstruyendo el flujo normal.

<b>Colesterol no HDL</b>	diferencia que se obtiene entre el valor de colesterol total y el colesterol.
<b>Colesterol VLDL:</b>	lipoproteínas de muy baja densidad que se sintetizan en el hígado; están encargadas de transportar los triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos a los tejidos extrahepáticos.
<b>Concentración media de hemoglobina (CHCM) :</b>	forma en que se determina la concentración de hemoglobina en un volumen determinado de glóbulos rojos.
<b>Eritrocitos:</b>	células que se encuentran conformando la sangre y contienen hemoglobina en su interior. También se les denomina glóbulos rojos y su función principal es ser portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo.
<b>Eosinofilos:</b>	células sanguíneas también llamadas leucocitos, las cuales son de tipo granulocito; se conforman en la médula ósea.
<b>Fosfatasa alcalina (ALP):</b>	enzima hidrolasa encargada de eliminar grupos fosfato por desfosforilación de nucleótidos, proteínas y alcaloides.
<b>Gamma glutamil transpeptidasa (GGT):</b>	enzima con capacidad de catalizar una reacción química en el organismo. Se encuentra en el hígado y conductos biliares.
<b>Glucosa sérica:</b>	es una hexosa perteneciente a los azúcares, compuesta por seis átomos de carbono y un grupo carbonilo . Esta puede ser medida en sangre.
<b>Globulina:</b>	proteína animal y vegetal que interviene en la coagulación sanguínea ya que se encuentra en el suero sanguíneo.
<b>Hemoglobina:</b>	proteína que se encuentra en los glóbulos rojos y está encargada del transporte de oxígeno .
<b>Hemoglobina corpuscular media (HCM):</b>	medición de la masa de hemoglobina que se encuentra dentro de un glóbulo rojo.

<b>Hematocrito:</b>	es el porcentaje en volumen de eritrocitos en sangre.
<b>Leucocitos:</b>	se denominan también glóbulos blancos; están dentro de la sangre transitoriamente e intervienen en la respuesta inmunitaria. Se originan en la médula ósea y tejido linfático.
<b>Linfocitos:</b>	células de tipo leucocito (agranulocito) encargadas de la inmunidad específica o adquirida.
<b>Macrófago:</b>	célula que se encuentra presente en diferentes órganos, tiene función fagocitaria y proviene del sistema retículo endotelial.
<b>Monocitos:</b>	glóbulos blancos agranulocitos, los cuales dan origen a los macrófagos y también tienen función fagocitaria. Se crean en la médula ósea.
<b>Neutrófilos:</b>	tipo de glóbulo blanco (agranulocito) que tiene como función fagocitar y destruir a bacterias así como participar en el inicio del proceso inflamatorio.
<b>Nitrógeno ureico:</b>	cantidad de nitrógeno que circula en forma de urea en el torrente sanguíneo.
<b>Proteínas totales:</b>	mide la cantidad total de albúmina y globulina en porción líquida dentro de la sangre.
<b>Plaquetas:</b>	Corpúsculos anucleados con multitud de gránulos citoplasmáticos que son segregados durante su activación.
<b>Transaminasa glutámico oxalacética (AST):</b>	enzima catalítica que se encuentra en corazón, hígado y tejido muscular. Pueden determinarse cantidades elevadas de esta enzima en el suero sanguíneo cuando se ha dado infarto de miocardio y hepatopatía aguda así como el empleo de determinados fármacos.
<b>Transaminasa glutámico pirúvica (ALT):</b>	enzima catalítica normalmente puede encontrarse en concentraciones elevadas en el hígado. Cantidades por encima de lo normal en suero sanguíneo indican lesión hepática.
<b>Urea sérica:</b>	Producto final que se obtiene del metabolismo de las proteínas,

se produce en el hígado y se elimina en los riñones. El aumento de ésta significa mal funcionamiento del riñón.

**Volumen globular medio (VGM):** medida del tamaño de eritrocitos expresados en fentolitros. Aumenta cuando se presenta anemia y disminuye cuando hay deficiencia de hierro.



## Resumen

Las algas contienen varios fucanos y galactanos sulfatados que presentan actividad anticoagulante y es importante determinar si estas moléculas generan efectos secundarios a largo plazo. En el presente trabajo se evaluó la actividad moduladora de la coagulación sanguínea “*in vivo* e *in vitro*” de polisacáridos sulfatados obtenidos de *Macrocystis pyrifera*. El extracto crudo se obtuvo a partir de 1 kg de alga con agua destilada a 55°C. La solución clarificada fue sometida a un fraccionamiento sólido-líquido en DEAE-celulosa con eluyentes de NaCl a 0.5, 1 y 2 M. Se obtuvieron cuatro fracciones, de las cuales 06-019-61 F1A (23.529 g), mostró 183.90 en la prueba de tiempo de protrombina (TP) así como 260s de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Se envió 0.2 g de la fracción a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN para determinación de resonancia magnética nuclear y espectrofotometría de infrarrojo en CICIMAR-IPN. En las pruebas *in vivo* se aplicaron las dosis de 5, 2, 0.5 mg/kg de la fracción 06-019-61 F1A vía intraperitoneal al organismo *Mus musculus* (Cepa CD-1) durante tres meses y se realizó análisis de biometría hemática, tiempos de coagulación (TP Y TTPa) y Química sanguínea (SMAC24). Cada uno de los análisis anteriores, se sometió al método estadístico de Friedman, el cual mostró diferencias significativas solo en dos parámetros de biometría hemática y un parámetro de SMAC 24. Los ensayos de TP y TTPa *in vivo* mostraron inhibición del coágulo en los primeros 15 días de tratamiento, después fueron normales (13s y 45s respectivamente). En los análisis histológicos se encontró infiltración bacteriana en ventrículo izquierdo de corazón, infiltración grasa en miocardio y pericardio; en hígado se encontró hemosiderina, hiperplasia y deformación de hepatocitos. En riñón se encontró deformación de túbulos proximales y distales, hiperplasia y dilatación glomerular. El pulmón mostró hiperplasia y al igual que el bazo, infiltración sanguínea y hemosiderina. En médula ósea se encontró infiltración grasa.

## Abstract

Algae contain various sulfated galactans and fucans having anticoagulant activity and it is important to determine whether these molecules produce long term side effects. In this study we evaluated the modulatory activity of blood coagulation "*in vivo* and *in vitro*" sulfated polysaccharide obtained from *Macrocystis pyrifera*. The crude extract was obtained from 1 kg of seaweed with distilled water at 55 ° C. The clarified solution was subjected to a solid-liquid fractionation on DEAE cellulose eluting with NaCl at 0.5, 1 and 2 M. Four fractions were obtained, of which F1A 06-019-61 (23.529 g), showed the prothrombin time test (PT) for 183.90s and 260s of activated partial thromboplastin time (aPTT). It sent 0.2 g of the fraction to the Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN for determination of nuclear magnetic resonance and determination infrared spectrophotometry in CICIMAR-IPN. *In vivo* tests were applied doses of 5, 2, 0.5 mg/kg of fraction F1A 06-019-61 via intraperitoneal at the organism *Mus musculus* (strain CD-1) for three months and performed blood count analysis, clotting times (PT and aPTT) and blood chemistry (SMAC24). Each of the above analyzes, underwent Friedman statistical method, which showed significant differences in only two parameters OF blood count analysis and only one in SMAC 24. The PT and aPTT tests showed inhibition of *in vivo* clot in the first 15 days of treatment, were normal after (13s and 45s, respectively). The histological analyzes showed bacterial infiltration in the left ventricle of heart and fatty infiltration in myocardium and pericardium; hemosiderin found in liver, hyperplasia and hepatocyte deformation. Was found deformation in proximal tubule and distal in kidney, hyperplasia and dilation of glomerulus. Showed hyperplasia in lung and like spleen, blood infiltration and hemosiderin. In bone marrow fat infiltration was found.

## 1. Introducción

Los estudios llevados a cabo para determinar la actividad anticoagulante se han desarrollado a la par con la fase histórica en la investigación hemostática. En la mayoría de ellos, se han utilizado técnicas con anticoagulantes de origen animal siendo los glucosaminoglucanos y proteoglucanos los que han demostrado contener una mayor actividad anticoagulante. Dicha actividad observada en los glucosaminoglucanos es mediada por un específico cofactor plasmático llamado antitrombina y cofactor de heparina II (Rosenberg & Rosenberg, 1984; Shanmugam & Mody, 2000; Pereira *et al.*, 2002).

La heparina es el más potente glucosaminoglucano conocido terapéuticamente y comprende varios sulfatos alternados 1→4 en residuos de ácido urónico y D-glucosamina cuyo efecto anticoagulante importante a la alta afinidad por la antitrombina III. Esta unión provoca un cambio conformacional en antitrombina III, de modo que se genera la inactivación de la trombina IIa, factores IXa y Xa. Así también, las heparinas no fraccionadas consisten en una mezcla heterogénea de polisacáridos que tienen un peso molecular medio de 15000 Da; éstas también se denominan heparinas de bajo peso molecular siendo más débiles inhibidores de la trombina, pero con la capacidad de suprimir el factor Xa en un grado similar (Shanmugam y Mody, 2000; Blann *et al.*, 200).

El heparán sulfato y dermatán sulfato (entre otros polisacáridos sulfatados endógenos) juegan también un rol fisiológico anticoagulante de gran interés. No obstante, a pesar de que la heparina (y sus derivados) es el anticoagulante primario en la industria farmacéutica tiene algunas desventajas ya que es extraído de órganos internos de mamíferos superiores por lo que su producción es difícil, además de que llega a provocar hemorragias, trombocitopenias y osteoporosis como efectos secundarios (Shanmugam y Mody, 2000; Blann *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002; Ronhua *et al.*, 2002).

En los últimos 50 años, los organismos marinos han sido reconocidos por la producción de polisacáridos con actividad moduladora de la coagulación sanguínea y han adquirido gran relevancia de estudio, principalmente los polisacáridos sulfatados

(Matsubara, 2004). Dentro de éstos podemos encontrar los fucoidanos que se obtienen de las algas pardas (Phaeophytas); éstos organismos producen una familia de fucanos sulfatados tales como el fucoidan, fucoidin, ascopilan, sargassan y glucuronoxilofucan entre otros y tienen como base estructural la L-fucosa, D-xilosa, D-ácido glucurónico, D-manosa y D-galactosa. Así también, los fucanos presentan una minoría significativa de proteínas que no pueden ser removidas y han mostrado directa inhibición de la trombina cuya acción está mediada por la antitrombina o cofactor de heparina II considerando su actividad equivalente o superior a la heparina (Shanmugam y Mody, 2000; Duarte *et al.*, 2001).

Sin embargo, la composición estructural de los fucoidanos y su actividad puede variar de acuerdo a las especies algales de las que sean extraídos, temporada de cosecha y las condiciones climáticas locales. Así, cada fucoidano recién descrito es un compuesto único con características estructurales únicas y por consiguiente, tiene el potencial de ser utilizado como un nuevo fármaco. Es por esto que los fucoidanos de varias especies de algas pardas se han investigado y todavía hay análisis en curso (Silva *et al.*, 2005; Morya *et al.*, 2012).

Como una alternativa, recientemente en el grupo de Química de Algas Marinas del CICIMAR-IPN han realizado estudios sobre el recurso algal de Baja California Sur como fuente de polisacáridos sulfatados con actividad moduladora de la coagulación sanguínea, los resultados obtenidos han sido muy prometedores, y se ha logrado obtener polisacáridos con actividad comparable a la heparina en ensayos *in vitro* (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque los resultados han sido excelentes, faltaban estudios relacionados con la evaluación de los efectos de estos polisacáridos en sistemas vivos, con lo cual se complementarían los estudios antes mencionados. En este proyecto de investigación se realizó el estudio del alga parda *Macrocystis pyrifera* como fuente de polisacáridos sulfatados con actividad moduladora de la coagulación sanguínea, utilizando las pruebas típicas de tiempo de protrombina (TP) y tiempo (TTPa) de tromboplastina parcialmente activada y un modelo *in vivo* de ratón como componente innovadora.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Mecanismo de coagulación sanguínea**

El mecanismo de coagulación sanguínea se ha interpretado mediante la hipótesis de la cascada de coagulación, la cual está compuesta de una serie de reacciones proteolíticas enlazadas. En cada etapa del mecanismo un zimógeno inicial se convierte en una serina proteasa la cual es responsable de una transición posterior zimógeno – serina proteasa. Dichos zimógenos que participan en la coagulación son denominados cofactores y se les identifica con números romanos (Rosenberg y Rosenberg, 1984).

En la mayoría de los casos, las proteínas cofactores que están presentes pueden ser activadas por serina proteasas y poseer la capacidad de obligar a reactivarse por encima de las superficies de células específicas; este proceso usualmente conduce a una dramática aceleración así como la localización parcial de las reacciones. El resultado final de estas transformaciones es la generación de trombina, que es capaz de actuar sobre el fibrinógeno y las plaquetas para produciendo el tapón hemostático (Rosenberg y Rosenberg, 1984).

Para llevar a cabo lo anterior se sabe que hay dos vías, la vía intrínseca activada que se origina cuando la sangre se encuentra en contacto con determinadas superficies y la vía extrínseca iniciada al producirse el daño tisular (Figura 1). En la activación por contacto participan los factores XII, XI, la precalicreína y el quininógeno de alto peso molecular (QAPM); la unión del factor XII a una superficie cargada negativamente produce un cambio en la molécula que a su vez desencadena un mecanismo de auto activación (Díaz-Concepción & Almagro-Vázquez, 2001).

El factor XIIIa actúa proteolíticamente sobre el factor XI y la precalicreína, las cuales circulan unidas en fase fluida al QAPM permitiéndoles unirse a las superficies cargadas negativamente para su posterior reacción con el factor XIIIa (Díaz-Concepción & Almagro-Vázquez, 2001). Por otro lado el factor IX que se encuentra en el plasma se activa por el factor XIa en presencia de calcio; el factor IXa se encuentra unido a la superficie de las plaquetas por medio de sus fosfolípidos al igual

que el factor VIII formando el complejo IX/VIIIa el cual activa el factor X (Díaz-Concepción & Almagro-Vázquez, 2001).

La vía extrínseca es iniciada por la secreción del factor tisular (FT) o factor III en la sangre ocasionada por daño vascular. El FT es una proteína presente en células endoteliales, monolitos y macrófagos del tejido extravascular; el FT se une al factor VII formando el complejo FT/VIIa que es capaz de activar al factor X y IX de la coagulación. El factor X activado es capaz de activar en complejo con el factor V a la protrombina y formar trombina (IIa). El factor IX activado por el factor FT/VIIa activa cantidades adicionales del factor X y una vez activado este último convierte protrombina a trombina en una reacción que es acelerada a la vez por el factor V. En el paso final, la trombina rompe al fibrinógeno para generar monómeros de fibrina los cuales polimerizan unos con otros para formar químicamente un coagulo estable X (Díaz-Concepción & Almagro-Vázquez, 2001).

Es posible simular en condiciones de laboratorio la cascada de coagulación por medio de dos ensayos: ensayo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y tiempo de tromboplastina (TP); en el TTPA se puede medir el tiempo de coagulación en presencia de una tromboplastina que estimula la superficie plaquetaria y se ha estipulado que el tiempo normal para el plasma humano es de 35 a 38 s. El TP se basa en las reacciones para generar el activador del factor X, el activador de protrombina, la generación de trombina y el paso de fibrinógeno a fibrina donde intervienen los factores II, V, VII, X; el tiempo normal en plasma humano para este ensayo es de 12 s X (Díaz-Concepción & Almagro-Vázquez, 2001).

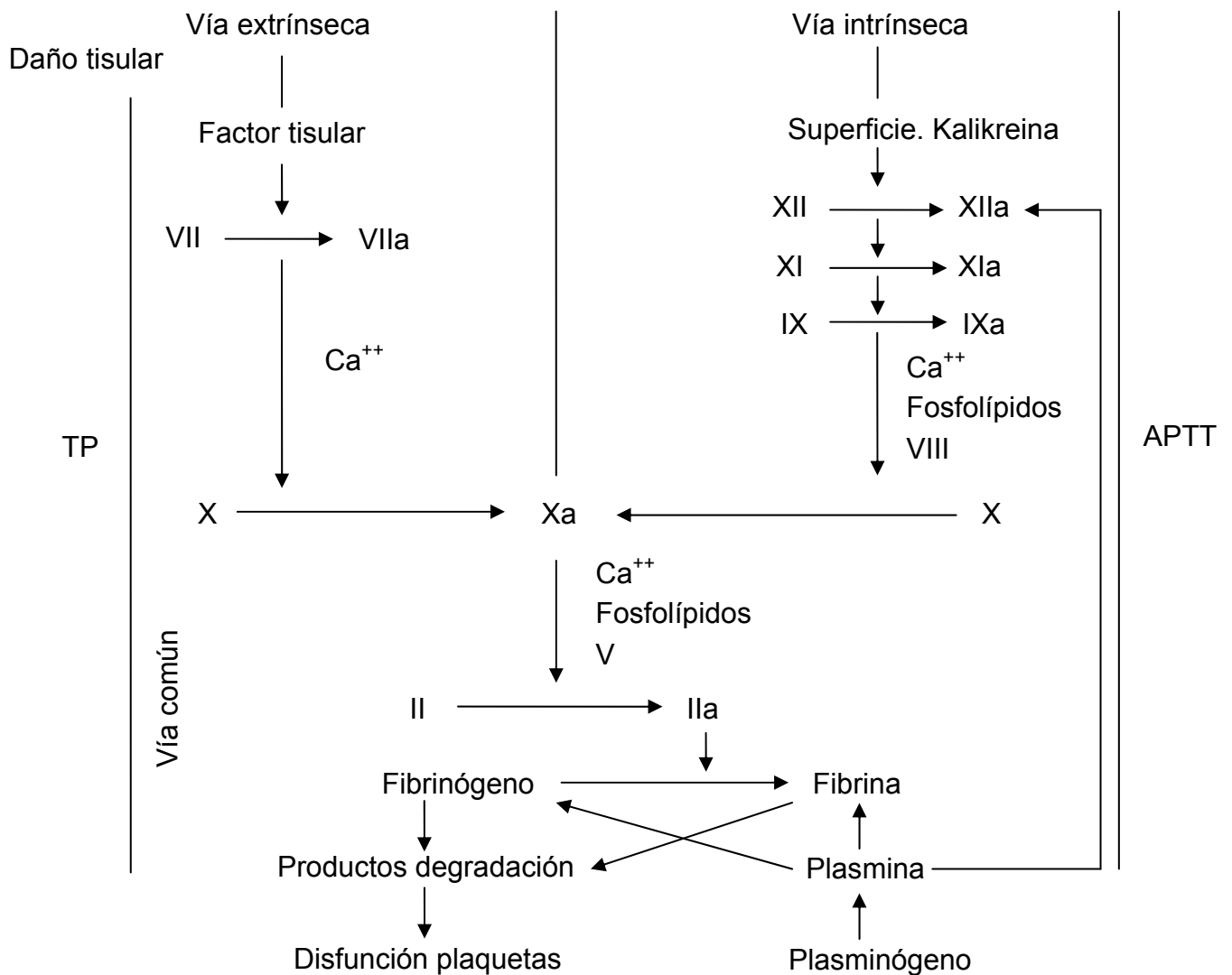


Figura 1. Representación de la cascada de coagulación.

## 2.2. Las algas marinas y su actividad anticoagulante

Tras el descubrimiento de la estructura molecular del fucoidan, realizada por Kylin (1913), otras estructuras de fucanos provenientes de algas pardas han sido investigadas y deducidas (Li et.al., 2008; Morya et. al, 2012); la diversidad en la distribución dentro del tejido algal no sólo fue su característica interesante sino

también la divergencia estructural. En 1957, Springer y colaboradores reportaron al fucoidan (polímero de L-fucosa con ligandos primarios sulfatados  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  2) proveniente del alga parda *Fucus vesiculosus* con actividad anticoagulante *in vitro* e *in vivo* (Church *et al.*, 1988).

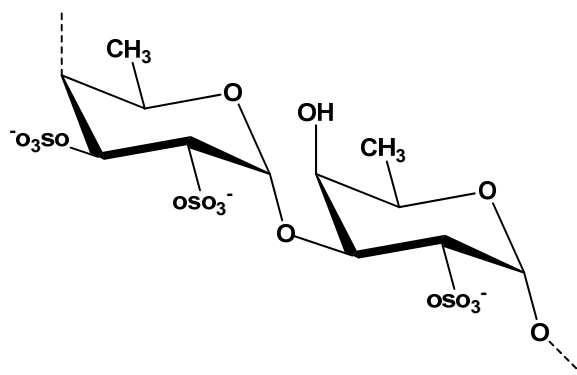


Figura 2. Estructura química del fucoidan.

Extractos crudos y fracciones (A y B) de *M. pyrifera* han sido evaluados en ensayos de actividad antitumoral, citotóxica y respuesta inmune-humoral. En ellas, se encontró que en las pruebas *in vivo*, el fucoidan y las fracciones A y B fueron tóxicas ( $12 \text{ mg kg}^{-1}$ ) mientras que en las pruebas citotóxicas no se encontró actividad. En cuanto a las pruebas de inmunidad, la fracción A mostró una significativa disminución en la hemaglutinación ( $p < 0,01$ ;  $4.2 \pm 0.29$ ) y el alginato de sodio mostró un aumento significativo de los títulos de hemaglutinación ( $p < 0,01$ ;  $7.8 \pm 0.48$ ); el Fucoidan y laminaran no mostraron ningún efecto sobre la cinética de la respuesta inmune humoral (Mayer *et al.*, 1987).

Por otro lado, fracciones con fucanos de bajo peso molecular extraídos del alga parda *Ascophyllum nodosum* han exhibido actividad antitrombótica venosa aproximadamente de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $\text{ED}_{80}$ ), después de 2 h de ser aplicada en una sola inyección subcutánea; su actividad fue comparable a la heparina de bajo peso molecular (dalteparina  $\text{\textcircled{R}}$ ). Estas fracciones de bajo peso molecular se compararon mediante una inmovilización Wessler modelo de trombosis en los conejos y por la determinación *in vitro* y *ex vivo* de las actividades de anticoagulantes.



Administraciones por vía intravenosa de estas fracciones redujeron la trombosis de una manera dosis-dependiente (Vidal et. al, 2000).

Así también, el efecto *in vivo* del fucoidan contra la trombosis también ha sido evaluado en conejos; se comparó fucoidan y heparina observándose un tiempo de oclusión de  $43.7 \pm 5.5$  min con una dosis de 2 mg/kg y  $55.4 \pm 2.6$  min con una dosis de 1 mg/kg respectivamente. En las pruebas realizadas con el modelo de ratón obtuvieron que a una concentración de 2.5 el tiempo de inclusión del fucoidan fue de  $31.9 \pm 9.3$  min y la heparina a la misma concentración fue de  $60.0 \pm 0$  min (Jouault et. al, 2003).

El alga parda *Dictyota menstrualis* ha mostrado actividad anticoagulante en el ensayo de TTPA con 20 mg/mL; también se reportan heterofucanos con actividad anticoagulante proveniente de *D. menstrualis* (Albuquerque et. al., 2004; Rocha et. al., 2004). Pruebas de TTPA y TP en 49 especies de algas colectadas en el Golfo y Caribe Mexicano mostraron que las especies *Anadyomene stellata* (>10 min en ambos ensayos), *Caulerpa cupressoides* (2.3 y >10 min), *Lobophora variegata* (>10 min) y *Liagora farinosa* (>10 min) fueron más activas (De Lara, 2004).

Así también, del alga parda *L. variegata* se ha extraído un heterofucano sulfatado, compuesto de fucosa, galactosa lactosa y sulfato en relaciones molares de 1:3:2 probándose en ensayos de TTPA, donde determinó que las concentraciones de 2, 10, y 50  $\mu$ g retrasaron la coagulación a 60, 110 y 165 s respectivamente y en las pruebas de TP a las mismas concentraciones fue 14, 13 y 15 s (Medeiros et.al, 2008); de igual manera, un heterofucano proveniente de *Padina gymnospora*, mostró actividad anticoagulante en el ensayo TTPA de >240s y una estructura conformada principalmente por 3- $\beta$ -D-ácido glucurónico 1 $\rightarrow$  ó 4- $\beta$ -D-ácido glucurónico substituyendo C-2  $\alpha$ -L-fucosa o  $\beta$ -D-xilosa (Silva, 2005).

La evaluación 41 extractos acuosos (obtenidos a 25 y 80°) y colectadas en Baja California Sur, mostraron actividad con el ensayo TP y 29 en TTPA; el extracto más activo fue el obtenido de *Eisenia arborea* incrementando el TTPA y TP control a más de 300s a una concentración de 322.3  $\mu$ g/mL. A partir de una fracción de *E. arborea* caracterizó un heterofucano sulfatado compuesto por fucosa unida en enlaces 1 $\rightarrow$ 3 y

una alta proporción de grupos ester-sulfato en posición axial C-4 y/o grupos acetato (Muñoz-Ochoa, 2006 y 2009).

*Fucus evanescens* ha sido evaluada *in vitro* e *in vivo* donde se encontró la inhibición del coagulo sanguíneo en pruebas de TTPA y TP con 3.3 y 4.7 s respectivamente, después de quince minutos de su inyección. La administración de dicho polisacárido reduce la hipocoagulación inducida en los ratones. En las pruebas *in vitro* el mismo fucoidan inhibió el coagulo sanguíneo a 26.5 s (1000 mg/mL) en la prueba TTPA, mientras que la heparina mostró 20.2 s en el mismo ensayo. En las pruebas de TP fue de 3.7 s y 27.2 s respectivamente. Por su parte, una fracción de alto peso molecular (FVEHigh) proveniente de *Fucus vesiculosus*, mostró inhibición del coagulo sanguíneo por arriba de los 2000 s. También, Fucoidanos provenientes de *Laminaria saccharina* tuvieron  $33.0 \pm 2.0$  U/mg,  $40.8 \pm 0.8$  s y  $72.8 \pm 2.1$  s para TTPA, TP y TT así como *Fucus distichus*  $26.9 \pm 1.7$  U/mg,  $33.0 \pm 0.6$  s y  $29.0 \pm 1.0$  s respectivamente (Kuznetsova et al., 2003; Kuznetsova, 2009; Holtkamp & Ruhr, 2009; Ushakova et. al, 2009)

La evaluación de actividad anticoagulante (ensayos de TP y TTPa) de polisacáridos en extractos acuosos (obtenidos a 25, 55 y 85 °C) de *Sargassum sinicola*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Lessonia nigrescens* indicaron que *M. pyrifera* inhibió la formación del coagulo sanguíneo por mayor tiempo en comparación con las otras especies, incrementándose a 105 s a una concentración de 333 µg/mL y en el análisis TTPa el mayor tiempo de coagulación se obtuvo con *M. pyrifera* y *S. sinicola* con un valor de 300 s (Aguilar-Resendiz, 2010).

En el análisis *S. sinicola* obtuvo el mayor porcentaje de azúcares seguido de *M. pyrifera* y esta última contenía una mezcla de polisacáridos solubles compuesta de alginato (32-35%), fucoidano 38-44.9% y otros polisacáridos (26-22.7) (Aguilar-Resendiz, 2010). Los espectros de infrarrojo para los extractos de *M. pyrifera* revelaron presencia de grupos sulfatos axiales en posición O-4. En otros estudios se realizó la purificación del extracto fermentado de *Sargassum fulvelluma* donde la fracción fermentada y purificada (denominada ASP) resultó activa en los ensayos de TTPA y TP a la concentración de 180 mg/mL (De Zoysa et.al, 2008; Aguilar-Resendiz, 2010).

Por otra parte, *Undaria pinnatifida* se encontró la composición manomérica del fucoidan en los esporofitos correspondiente a fucosa, galactosa, xilosa y manosa en una relación molar de 1, 0.2, 0.02, 0.15 respectivamente; su actividad anticoagulante por ensayo TTPA ( 5 µg de fucoidan) retrasó el tiempo de coagulación en la sangre alrededor de 5 veces más que el control y 1.5 veces más que la misma cantidad de fucoidan comercial (Kim et. al., 2007).

La toxicidad *in vitro* e *in vivo* del fucoidan extraído de *Undaria pinnatifida* también se ha evaluado en micronúcleos de médula ósea; todos los niveles probados de fucoidan no cambiaron la proporción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de células de los huesos de ratón. En el ensayo *in vivo* de toxicidad, el fucoidan (0 a 2000 mg/kg) se administró por vía oral a ratas durante 28 días y no hubo cambios toxicológicos en los análisis bioquímicos, análisis hematológicos, necropsia e histopatología del hígado. Los niveles plasmáticos de ALT (Alanina transaminasa) fue bajo pero significativamente se incrementó en las ratas macho a 2000 mg/kg/día (Chung et. al., 2010).

Así también se ha se aplicado vía oral a 20 humanos el fucoidan de *U. pinnatifida*. El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), tiempo de trombina y antitrombina-III se analizaron de acuerdo a los métodos estándar. Con lo anterior observaron que el tiempo de tromboplastina parcial aumentó 28.41 a 34.01 s (n=10, P=0.01), tiempo de trombina se redujo de 18.62 a 7.55 s (n=10, P=0.04), y la antitrombina III-mayor 113.5 a 117% (n=10, P=0.03) (Irhimeha et. al., 2009)

Barros Gómez -Camara y colaboradores (2011) extrajeron seis fucanos de *Canistrocarpus cervicornis* por digestión proteolítica seguido por precipitación de la acetona. Estos heterofucanos se componían principalmente de fucosa, ácido glucurónico, galactosa y sulfato. Ninguno de esos polisacáridos fue capaz de prolongar el tiempo de protrombina (PT) a la concentración ensayada. Sin embargo, todos los polisacáridos prolongaron el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Cuatro polisacáridos sulfatados (denominados CC-0.3, CC-0.5, CC-0.7 y CC-1.0) se duplicaron el TTPA con sólo 0,1 mg/ml de plasma siendo 1.25 veces menos cantidad requerida en comparación con un comercial de heparina de bajo peso molecular (Clexane ®).

A partir de *Laminaria saccharina* se han obtenido polisacáridos sulfatados denominados Ls-1.0 que provenía de una fracción principalmente a base de mannoglucuronofucanos con O-sulfatados y Ls-1.25 la cual era una fracción compuesta principalmente por fucanos sulfatados. Ambas fracciones inhibieron el reclutamiento de leucocitos en un modelo de inflamación en ratas, Ls-1.25 parecía ser más activo que Ls-1.0. Además, estas fracciones inhibieron la adhesión de neutrófilos a plaquetas de bajo flujo. Sólo la fracción Ls-1.25 presentó actividad anticoagulante (29.261.6 U/mg) medida por el ensayo de TTPa mientras Ls-1.0 no presentó actividad (Crocì *et al.*, 2011).

### **2.3. Uso del modelo de ratón en la investigación**

A mediados del siglo XVI, cuando la biología evolucionó progresivamente de ser una ciencia descriptiva a experimental, los ratones, ratas y otros pequeños vertebrados se empezaron a utilizar en la investigación (Hedrich y Bullock; 2004). Por lo tanto, las instituciones de investigación biomédica se encuentran literalmente invadidas por ratones ya que más del 60% de los Institutos Nacionales de Salud los utilizan, específicamente modelos de ratón genéticamente modificados con enfermedades que suelen afectar a los seres humanos. Dichos modelos han demostrado ser efectivos en los sistemas humanos sólo con una adecuada validación y traducción de los datos obtenidos con los ratones. La validación de los modelos de ratón consiste en determinar en qué medida los atributos del sistema experimental (en este caso, el fenotipo del ratón) contrasta o no con los atributos de la enfermedad humana (Treuting *et al.*, 2012).

A medida que la enfermedad o condición humana está siendo modelada, el fenotipo se hace más complejo y la validez del modelo de ratón se vuelve más importante. Un modelo de ratón que no está debidamente validado en el ámbito científico si no justifica el uso de los animales, la inversión que se realizará en la investigación puede dar lugar a riesgos si los datos preclínicos obtenidos con los ratones se aplican incorrectamente a pacientes humanos. Por lo tanto, en los animales genéticamente modificados la caracterización fenotípica se realiza para proporcionar información acerca de la función del gen. Un objetivo importante de la

investigación biomédica básica y la genómica funcional es entender la acción de un gen *in vivo*. Con la orientación de genes y las tecnologías transgénicas desarrolladas, el ratón normal se ha convertido en el *campeón* de los animales genéticamente modificados (Treuting *et al.*, 2012).

Estas características han llevado al desarrollo de miles de posibles modelos de ratón genéticamente modificados que desarrollan enfermedades humanas. El uso de estos ratones para dilucidar los roles de genes, el producto de genes, y las vías en el sistema de un mamífero complejo continúan aumentando. En la actualidad el ratón es relativamente barato de mantener, el genoma está mapeado, son susceptibles de manipulación y su fisiología es similar a la humana (Treuting *et al.*, 2012). Así, al realizar un experimento específico que requiera una población uniforme de animales se utilizan cepas o líneas consanguíneas que no presenten diferencias genéticas entre ellos. También existen líneas no consanguíneas, las cuales carecen de homogeneidad y definición genética. No obstante son de costo reducido, fáciles de obtener, con alta tasa reproductiva y elevado vigor. Por lo tanto, las líneas no consanguíneas como la cepa CD-1 se utilizan principalmente en pruebas toxicológicas donde es preferible emplear animales genéticamente no idénticos pues así se simula mejor la situación en las poblaciones humanas (Medina, 2006).

#### **2.4. Descripción de los órganos sanos en ratón**

Para poder comprender cómo la histología y su análisis exhaustivo nos muestran el efecto de las sustancias dañinas en los tejidos, es necesario introducirnos primero al conocimiento de los tejidos sanos y su localización (Imagen 1). El corazón por ejemplo, se encuentra internamente dividido por cuatro cámaras, las aurículas izquierda y derecha separadas por el tabique interauricular, y los ventrículos izquierdo y derecho separados por el tabique interventricular (Imagen 2; Treuting *et al.*, 2012). La pared del corazón consiste en endocardio, miocardio y epicardio; el miocardio se encuentra conformado por fibras estriadas con núcleo céntrico y en la base contiene tejido conectivo fibroso como esqueleto de apoyo. Las válvulas entre las aurículas y los ventrículos están formadas por tejido conjuntivo y cubierto por endocardio (Hedrich y Bullock, 2004).

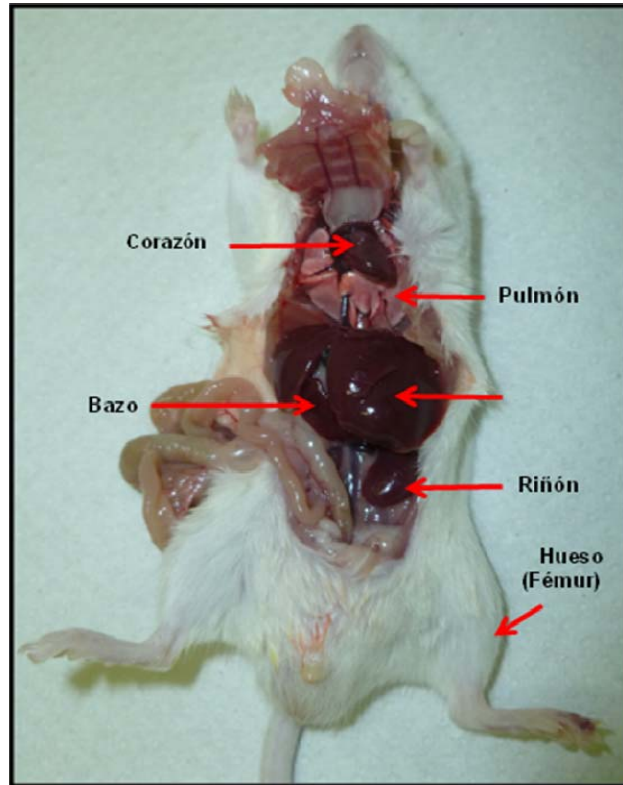


Imagen 1. Anatomía de los órganos del ratón *Mus musculus*.

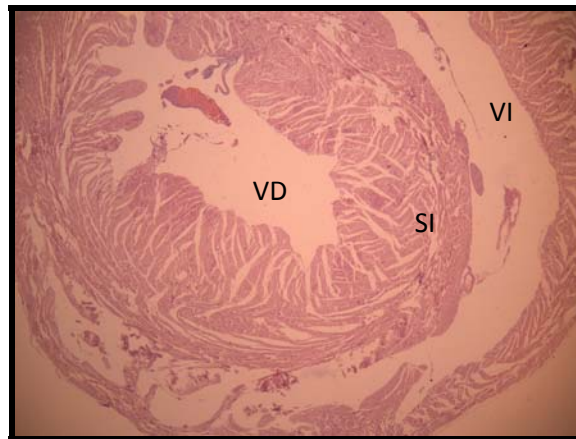


Imagen 2. Ilustración del corazón donde se observa el ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI) y el septo interventricular (SI).

Por su parte, los pulmones se conforman de parénquima pulmonar que incluye los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares y alvéolos (Imagen 3). El pulmón izquierdo forma un solo lóbulo, mientras que el pulmón derecho está dividido en lóbulos craneales, medios, caudales y accesorios. Al menos nueve patrones de

lobulación pulmonar se han descrito. En ellos se presenta una bifurcación traqueal donde la principal rama de bronquios se subdivide para formar los bronquios intrapulmonares; éstos han de terminar como bronquiolos. Las vías aéreas más grandes están revestidas por células columnares epiteliales, células Clara principalmente no ciliadas y células ciliadas (Hedrich y Bullock, 2004; Treuting *et al.*, 2012).

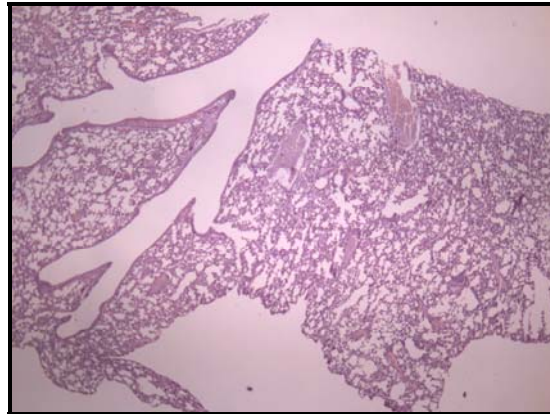


Imagen 3. Se observa tejido de pulmón.

Por otro lado, el hígado es un órgano que se encuentra cubierto por una cápsula fibrosa formando tabiques de tejido conectivo. El tejido hepático está dispuesto en lóbulos con tríadas portales en la periferia, y con una vena central en el medio (Imagen 4-A). Las tríadas portales consisten de ramas de arterias hepáticas y la vena portal, así como los conductos biliares intrahepáticos. La sangre fluye desde la vena cava hasta la zona perilobulillar, luego a la vena central por sobre las venas hepáticas grandes. Las células del hígado son denominadas hepatocitos y se disponen en cordones desde la vena central hacia la periferia lobular. Una característica del hígado del ratón es que se pueden presentar con normalidad anisocitosis y anisocariosis, una gran variación en el tamaño de las células del hígado y sus núcleos (Hedrich y Bullock, 2004; Treuting *et al.*, 2012).

Los hepatocitos tienen una superficie canalicular biliar, que junto con las superficies de otros hepatocitos forma el canalículo biliar, y una superficie perisinusoidal, que está separada por el espacio de Disse de la pared sinusoidal formada por células endoteliales (Imagen 4-B). Durante las primeras semanas de vida posnatal, los megacariocitos se pueden ver en el hígado de ratón. En contraste

con los lóbulos hepáticos, las unidades funcionales, definidos como los acinos, tienen su centro en las triadas portales y la periferia de la vena central (Hedrich y Bullock, 2004; Treuting *et al.*, 2012).

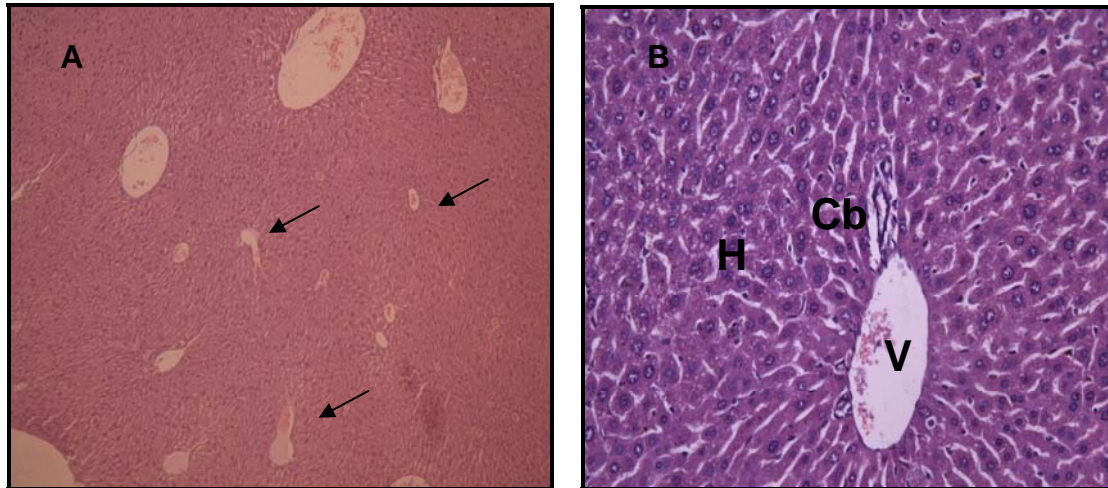


Imagen 4. Se observa tejido de hígado, donde la imagen A muestra con flechas las triadas portales; en la imagen B se visualiza la región portal con hepatocitos (H), conducto biliar (Cb) y vena central (V).

El riñón es unilobar conformado por una sola papila, dividido en corteza y médula (Imagen 5-A); la corteza contiene laberintos tubulares corticales (túbulos contorneados proximales), y rayos medulares que se extienden desde la médula externa. La médula se subdivide en una franja exterior denominada zona interna que conforma la papila. La unidad fundamental del riñón es la nefrona, la cual está compuesta por glomerulos, túbulos proximales, asas de Henle (descendentes y ascendentes), segmento de recta, mácula densa, y túbulo contorneado distal (Imagen 5-B) (Hedrich y Bullock, 2004; Treuting *et al.*, 2012). Las nefronas pueden estar en la zona de la corteza). Las nefronas están conectadas a los conductos colectores que corren hacia el conducto papilar; los conductos papilares se abren hacia la papila renal en la pelvis renal, la cual se encuentra revestida por un epitelio de células transicionales que constituyen el uréter. Los túbulos proximales se encuentran principalmente en la corteza conformados por células cúbicas con microvellosidades en el borde como cepillos y las porciones descendente y ascendente del asa de Henle se encuentran en la médula y están revestidos por



epitelio aplanado parecido al endotelio de los vasos sanguíneos. El inicio de los túbulos distales y la corteza tienen epitelio cuboidal similar a la de los túbulos proximales, pero carente de un borde en cepillo (Imagen 5- C). La parte recta de los túbulos distales conduce a la mácula densa en el polo vascular del glomérulo, donde la renina es producida por células especializadas. La vascularidad renal de los ratones es muy similar a la de otras especies de mamíferos (Hedrich y Bullock, 2004).

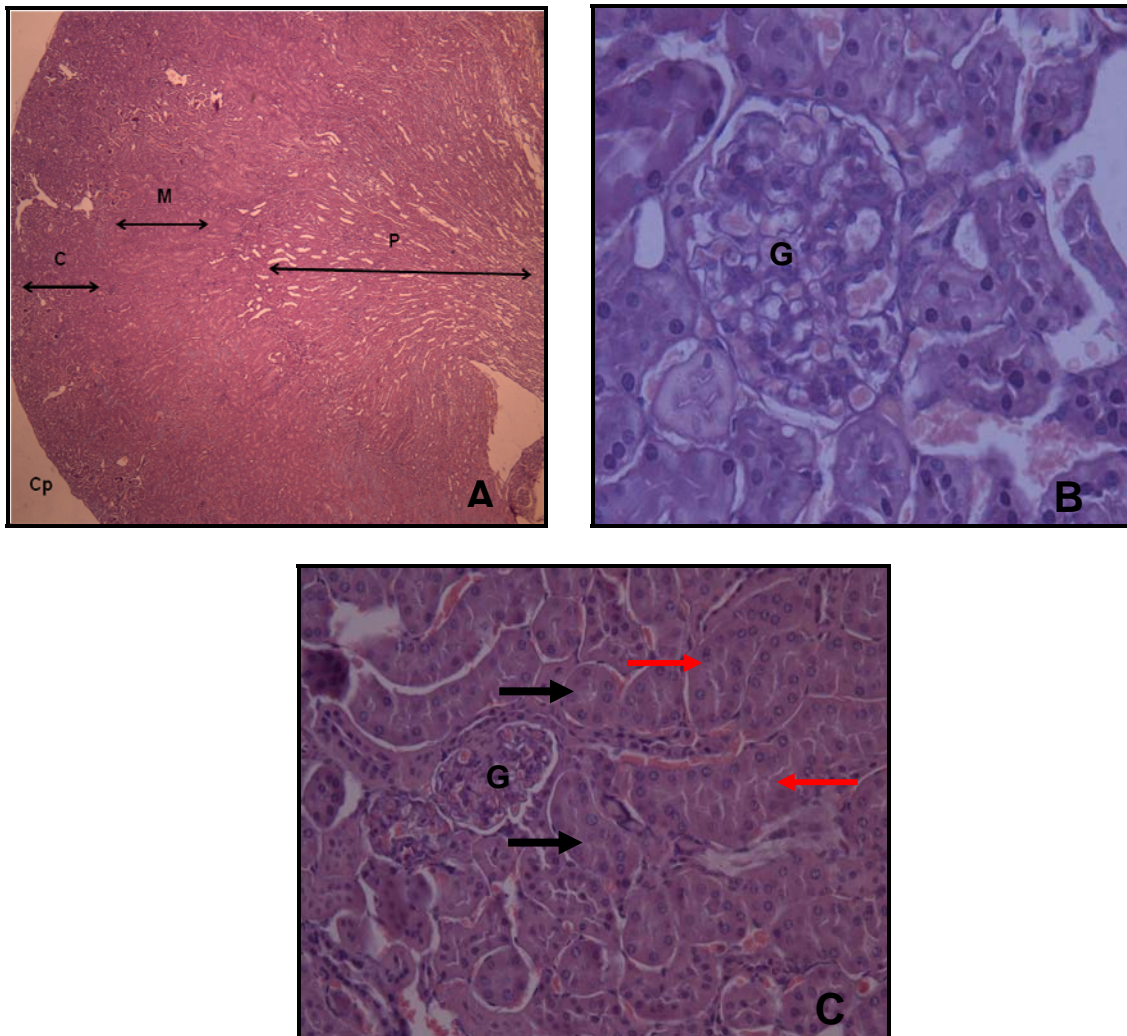


Imagen 5. Se observan diferentes cortes histológicos de tejido de riñón. La imagen A es el corte longitudinal de riñón, donde se observa corteza (C), médula (M), papila (P) y capsula (Cp); en la imagen B se observa la estructura glomerular (G) rodeada por túbulos distales y en la imagen C también se observa un glomérulo (G), túbulos contorneados distales (flechas rojas) y proximales (flechas negras).

El bazo es considerado el segundo órgano más grande inmuno-responsable de iniciar la reacción contra antígenos de transmisión sanguínea, filtrar el material extraño de la sangre y los glóbulos rojos viejos o dañados. Éste órgano se encuentra en la parte dorsocraneal izquierda en la cavidad abdominal (imagen 1) y es un órgano elongado con una sección triangular en la parte transversal, externamente está rodeado por una cápsula de tejido fibroso, fibras elásticas y musculatura lisa, con una capa superpuesta delgada de células mesoteliales. Internamente contiene tejido conectivo que se extiende hacia el parénquima esplénico conformando las trabéculas; la parénquima consiste en la pulpa roja y blanca (Imagen 6; Hedrich y Bullock, 2004; Cesta, 2006; Treuting *et al.*, 2012).

La pulpa blanca está organizada en hojas perioarteriolas linfoides y folículos linfáticos; la periferia de la pulpa blanca está formada por una menor densidad de células denominada zona marginal. En ella podemos encontrar linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, arteriolas y capilares en el marco reticular muy similar al que se encuentra en la pulpa roja (imagen 11). Por otro lado la pulpa roja contiene tejido reticular, espacios venosos y macrófagos asociados por lo que es el sitio de hematopoyesis extramedular (Hedrich y Bullock, 2004; Cesta, 2006; Treuting *et al.*, 2012).

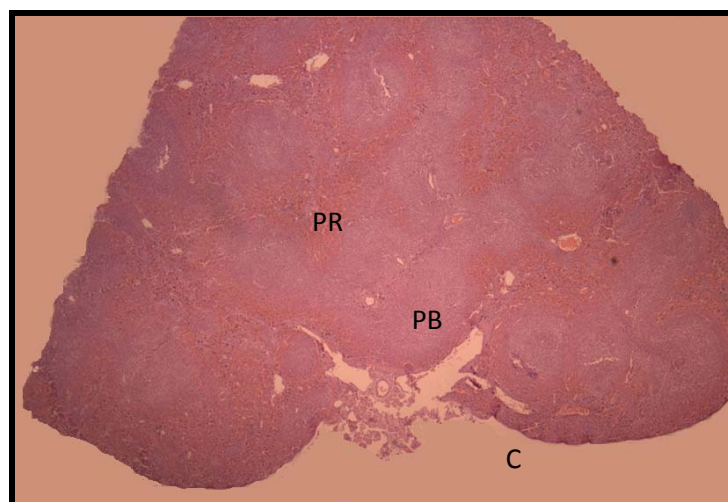


Imagen 6. Pulpa blanca (PB), pulpa roja(PR), capsula (C).

La médula ósea es el sitio principal donde se da la formación de la sangre (hematopoyesis) y se encuentra en los espacios huecos en huesos largos de los ratones adultos (Imagen 7); también puede describirse a grosso modo como médula roja (tejido hematopoyético predominante) o médula amarilla (grasa). Las células madre dentro de la médula ósea que tienen la función hematopoyética, están mínimamente diferenciadas en mielopoyéticas, eritropoyéticas y megacariocitopoyéticas. La mielopoyesis (granulopoyesis) implica una serie de pasos de maduración que conducen a la formación de granulocitos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos y basófilos mientras que la eritropoyesis es el proceso por el cual se genera la maduración de glóbulos rojos (eritrocitos); los megacariocitos maduros dan lugar a las plaquetas que son esenciales para la trombosis y hemostasia. Así mismo, se tiene elementos celulares de apoyo, como los fibroblastos, histiocitos (macrófagos), adipocitos, osteoblastos, osteoclastos y células endoteliales, que son importantes en la remodelación ósea y la vascularización.

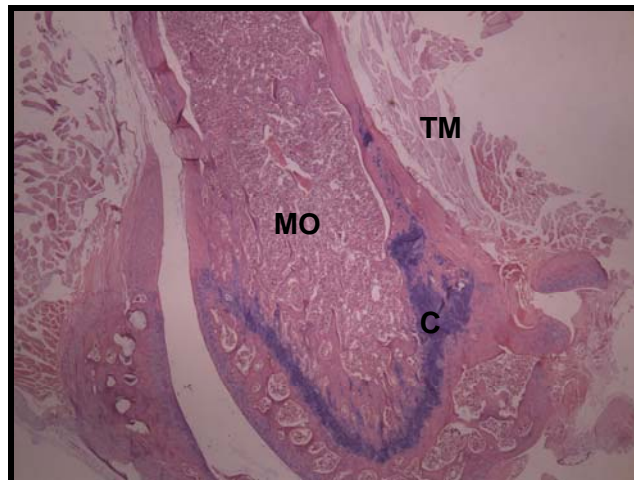


Imagen 7. Se observa el corte longitudinal del fémur con tejido muscular (TM), médula ósea (MO), cartílago en crecimiento (C).

### 3. Justificación

La heparina es la droga anticoagulante más comúnmente utilizada y presenta ventas anuales cercanas de hasta tres mil millones de dólares (Lui & Pedersen, 2007); siendo un activo altamente aplicado y tan costoso tiene sus limitaciones. Esta puede presentar reacciones adversas como el esparcimiento de trombocitopenia, urticaria, asma, anafilaxis, osteoporosis y hemorragias debidas a fragmentos no eliminados de heparina (Jappe *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2004).

Así también, se cree que la heparina pudiere contener varios contaminantes al ser un producto de origen animal (bovino o porcino) por lo que ha incrementado el temor en el uso de la misma; se establece que tal vez contenga residuos virales u otros agentes como priones causantes de encefalopatía espongiiforme (Pauper & Alban, 2000; Rocha *et al.*, 2004).

Sin embargo, este polisacárido se utiliza con fines terapéuticos contra enfermedades trombóticas. Los desordenes cardiovasculares están altamente relacionados con la trombosis la cual es una enfermedad que ocupa el segundo lugar en muertes después del cáncer. La incidencia de las enfermedades cardiovasculares a aumentado considerablemente en los últimos años principalmente en los países tercermundistas donde se le relaciona con el modo de vida de los habitantes como sedentarismo, hábitos alimenticios y estrés entre otros (Mulloy *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2004).

Para el 2007, la Secretaría de Salud establece que la tasa de mortalidad en México es del 60.5% de los hombres y 45.7 % de las mujeres por problemas isquémicos del corazón. En el 2008 se reporta a Baja California Sur con una tasa de mortalidad 69.6 % en hombres y 39.5 % en mujeres a causa de esa enfermedad. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos como los fucoidanos que contengan potencialidad anticoagulante con estándares iguales o superiores a la heparina (o moléculas semejantes) que no generen efectos secundarios a través de su uso es de gran importancia para el tratamiento de las enfermedades.

### 3.1. Hipótesis

En base a los estudios reportados sobre la actividad moduladora de la coagulación sanguínea a partir polisacáridos sulfatados extraídos de algas pardas, se sostiene que al menos una fracción del extracto acuoso obtenido de *Macrocystis pyrifera* tiene actividad anticoagulante *in vivo* similar o mayor a la heparina sódica sin generar efectos secundarios.

### 4. Objetivo general

Evaluar *in vivo* la actividad anticoagulante de los polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de *Macrocystis pyrifera* y su efecto toxicológico seguido a una administración prolongada.

#### 4.1. Objetivos particulares

- A) Obtener el extracto acuoso a 55 °C del alga café *M. pyrifera*.
- B) Obtener por precipitación fraccionada los polisacáridos sulfatados del extracto acuoso de *M. pyrifera*.
- C) Caracterizar los polisacáridos sulfatados activos con espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.
- D) Evaluar *in vitro* por medio de los ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa) la actividad anticoagulante de los polisacáridos sulfatados obtenidos de *M. pyrifera*.
- E) Evaluar *in vivo* por técnicas histológicas y hematológicas la fracción de polisacáridos sulfatados que resultó más activa en los ensayos de TP y TTPa en el modelo de ratón con el organismo *Mus musculus* (cepa CD-1).

## 5. Material y método

### 5.1. Colecta del material algal

El alga café *Macrocystis pyrifera* fue recolectada por el equipo de Química de algas marinas del CICIMAR el 9 de agosto del 2006 en Punta Eugenia, Baja California Sur, México (Imagen 13). El alga fue removida del sustrato rocoso en la zona intermareal a 1 m de profundidad. Todo el material algal fue puesto a secar al sol por tres días; se transportó al laboratorio donde las muestras fueron limpiadas de toda materia extraña y refrigeradas en bolsas de plástico a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Imagen 8. Mapa que muestra en color rojo el área dónde se obtuvo *Macrocystis pyrifera*.

## **5.2. Obtención de los extractos, purificación y caracterización**

Partiendo de lo reportado por Muñoz-Ochoa (2006 y 2009) se tomó 1 kg de alga seca-molida y se extrajo con agua destilada a 55°C en agitación continua por 4 h. El tejido fue removido por filtración simple y el filtrado se centrifugó para remover sedimentos hasta obtener soluciones claras. La solución clarificada se precipitó con EtOH destilado y el sólido se colocó en una estufa eléctrica a 50°C; posteriormente el sólido se sometió a extracción sólido-líquido en DEAE-celulosa eluidas con agua destilada en solución con NaCl a 0.5, 1 y 2 M. Se centrifugó y los precipitados obtenidos fueron secados en estufa eléctrica a 50°C, etiquetados como 06-019-61 F1A, 06-019-61 F2A, 06-019-61 F3A, 06-019-61 F4A y almacenados en refrigeración a -20°C hasta el momento de su utilización. De las fracciones obtenidas se enviaron 0.2 g en un eppendorf a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía para la obtención de resonancia magnética nuclear de protón.

## **5.3. Pruebas de actividad anticoagulante *in vitro***

Se extrajo 1 mL de sangre de *Mus musculus* (Cepa CD-1) con una jeringa marca Terumo 29G, ½" de 13 mm x 0.33 mm. La sangre se mezcló con solución de citrato de sodio al 3.5% en una relación 9:1 (v/v), el paquete celular se removió por centrifugación (1700 × g). El plasma recuperado fue almacenado a -18°C hasta el momento de su utilización.

Para el ensayo de tiempo de protrombina se tomaron 90 µL de plasma citrado, se mezclaron con 10 µL de una solución stock de los extractos de prueba (10 mg/mL) y fue incubado a 37°C por 1 min. Después de este tiempo se agregan 200 µL del reactivo TriniCLOT PT Exel by Trinity Biotech, plc. preincubado por 10 min a 37°C y se midió el tiempo de formación del coágulo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) se tomaron 90 µL de plasma citrado, se mezclaron con 10 µL del extracto crudo de prueba (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 1 min. Después de este tiempo se agregaron 100 µL del reactivo TriniCLOT Automated aPTT by Trinity Biotech, plc. se incubó por 3 min. a 37°C y se agregan 100 µL de CaCl<sub>2</sub> al 0.25%. Se midió el tiempo de formación del coágulo con un cronómetro. Todas las muestras fueron ensayadas

por duplicado, se calculó el promedio y la desviación estándar para cada extracto ensayado en ambas pruebas.

#### **5.4. Actividad anticoagulante *in vivo***

##### **5.4.1. Determinación de dosis**

Se determinó la dosificación de manera que se inyectó vía intraperitoneal 30, 15, 6, 5, 2 y 0.5 mg/kg de la fracción 06-019-61 F1A a dos organismos por dosis, después de 1 h se realizó un corte de cola y con un cronómetro se midió el tiempo de sangrado; se realizó de igual manera con la concentración de 2 y 6 mg/kg de heparina sódica.

##### **5.4.2. Soluciones inyectables**

Al obtener las dosis activas, se realizaron soluciones madre donde se diluyó 1 g, 0.4 g y 0.1 g de la fracción 06-019-61 F1A en solución salina inyectable PiSA (0.9%) de 100 mL y se etiquetaron como solución madre 1, 2 y 3 respectivamente; así también se diluyó 0.1 g de heparina sódica y se etiquetó como solución madre 4.

Posteriormente se tomaron 4 mL de la solución madre 1 y se diluyeron en 100 mL de solución salina inyectable PiSA (0.9%) para obtener la concentración requerida de 5 mg/kg; ésta se etiquetó como solución 1 y se le añadió la fecha de preparación. De igual manera se tomaron 4 mL de solución madre 2 y 3 diluyéndose en 100 mL de solución salina inyectable PiSA (0.9%) para tener la concentraciones requeridas de 2 y 0.5 mg/kg; se etiquetaron como solución 2 y 3 respectivamente. Después, se tomaron 16 mL de la solución madre 4 para obtener la concentración de 2 mg/kg de heparina sódica y se etiquetó como solución 4.

##### **5.4.3. Ensayos *in vivo***

Una vez obtenidas las soluciones a inyectar, se sometieron a prueba 120 organismos de ratón *Mus musculus* cepa CD-1 que tenían un peso de 25 a 50 g aproximadamente, posteriormente se marcaron en la cola usando el sistema de numeración maya y se conformaron diez grupos con doce organismos separados por



sexo; estos organismos se mantuvieron en cajas con rejillas y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Se conformaron cinco grupos de experimentación, donde cada uno tuvo 12 organismos macho y 12 hembra. Al grupo 1 se les aplicó 5 mg/kg del extracto 06-019-61 F1A; los grupos 2 y 3 se les inoculó la concentración de 2 y 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A respectivamente, mientras que al grupo 4 se le inyectó 2 mg/kg de heparina sódica. Al grupo 5 se le inyectó 1 mL de solución salina PiSA (0.9%). Las inoculaciones se realizaron vía intraperitoneal cada tercer día y el tratamiento se realizó por tres meses.

### 5.5. Análisis hematológico

De acuerdo al calendario de inoculación (Ver anexo 1), cada 14 días se tomaron 2 mL de sangre (aprox.) de dos organismos de cada tratamiento, los cuales estuvieron previamente anestesiados con isoflurano. Posteriormente se llevó la muestra sanguínea al laboratorio PrimeLab dónde se realizaron los análisis clínicos de biometría hemática, tiempos de coagulación sanguínea (TP y TTPA) y SMAC 24 (ver anexo 2). Se tomó la temperatura ambiental así como la humedad relativa del cuarto de experimentación dónde se encontraban los organismos. A los datos obtenidos en dichas pruebas, se les aplicó el estadístico no paramétrico denominado método de Friedman para bloques al azar o análisis de medidas repetidas de varianza; cabe señalar que se eliminó de la prueba el muestreo realizado el 23 de Mayo del 2012 sólo para los datos de química sanguínea y biometría hemática. La ecuación de dicho método es la siguiente:

$$\chi^2_F = \frac{12}{ba(a+1)} \sum_{i=1}^a R_i^2 - 3b(a+1)$$

Donde:

$\chi^2_F$  = Ji cuadrada

a = Número de tratamientos

b = Número de muestreo

$R_i^2$  = Suma de rango

## **5.6. Análisis histológico**

Se realizó necropsia de pulmón, hígado, bazo, riñón, corazón y hueso para ser colocados en formol amortiguado (9:1) dentro de un frasco de 100 mL; se mantuvieron en formol por 24 h y posteriormente se realizaron cortes de los sitios de interés para después colocarlos en cassettes de inclusión. Una vez realizado lo anterior, se realizó la técnica de tinción hematoxilina-eosina. Las laminillas se observaron con un microscopio Olympus BX51 adherido a la cámara micropublisher 5.0 RTV Qimaging; los objetivos utilizados fueron 4, 10 y 40x.

## **6. Resultados**

### **6.1 Obtención del extracto acuoso, precipitación fraccionada los polisacáridos sulfatados y pruebas *in vitro***

Al realizar la precipitación con EtOH se obtuvieron 70 g de extracto crudo etiquetado como 06-019-61 A, posteriormente fue sometido al fraccionamiento sólido- líquido y generó cuatro fracciones: 06-019-61 F1A (23.529 g), 06-019-61 F2 A (8.334 g), 06-019-61 F3 A (6.572 g) y 06-019-61 F4 A (4.737 g) como se observa en la figura 1. De las fracciones sometidas a las pruebas de TP y TTPa *in vitro*, la fracción 06-019-61 F1A presentó la mayor inhibición en la formación del coagulo sanguíneo en la prueba de TP con 183.9 segundos (Figura 4) así también fue mayor en la prueba de TTPa con tiempos de 260.4 y 247.2 s utilizando plasma sanguíneo de hembras y machos respectivamente (Figuras 5 y 6).

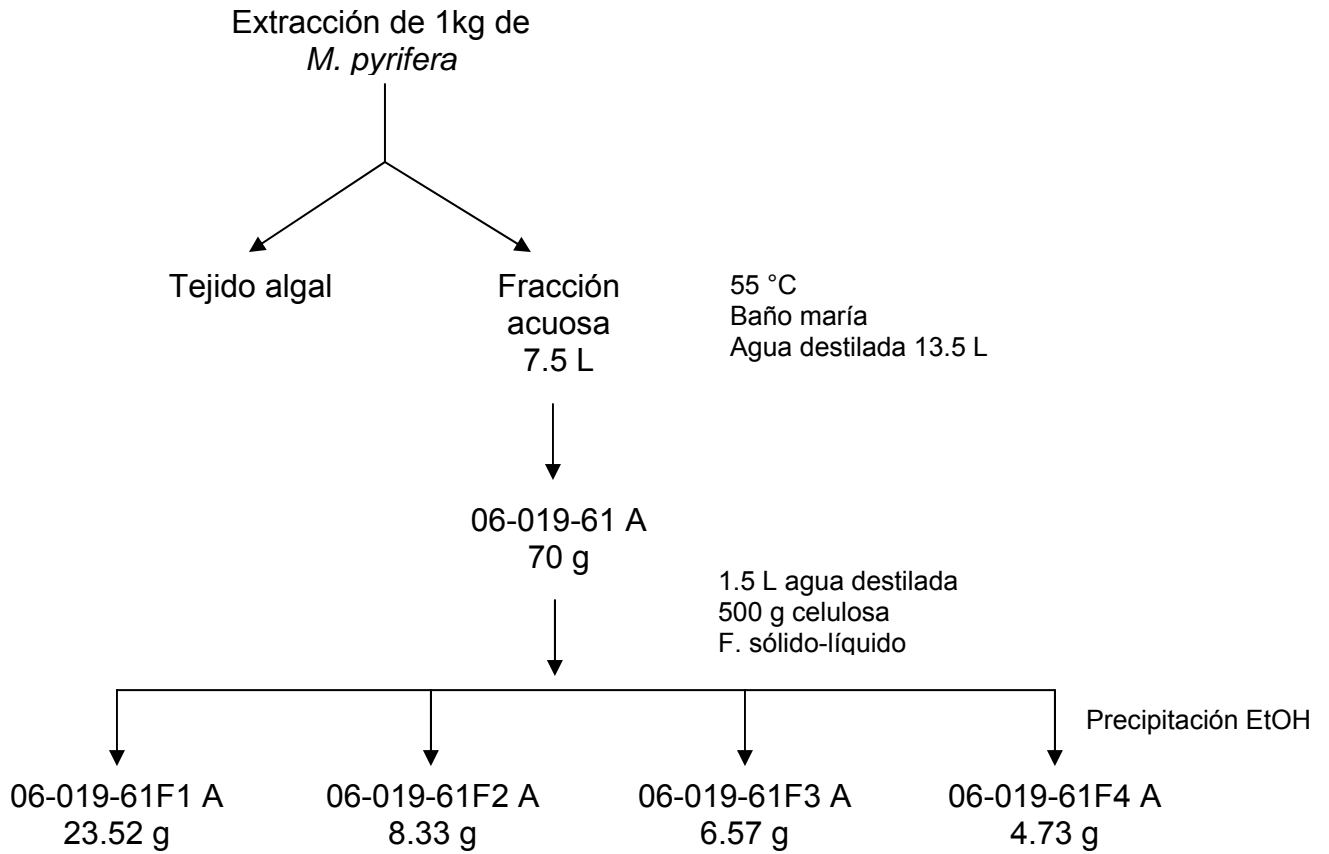


Figura 3. Diagrama de la extracción donde se muestran las fracciones obtenidas de *M. pyrifera*, así como los tiempos de coagulación sanguínea por el análisis de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos.

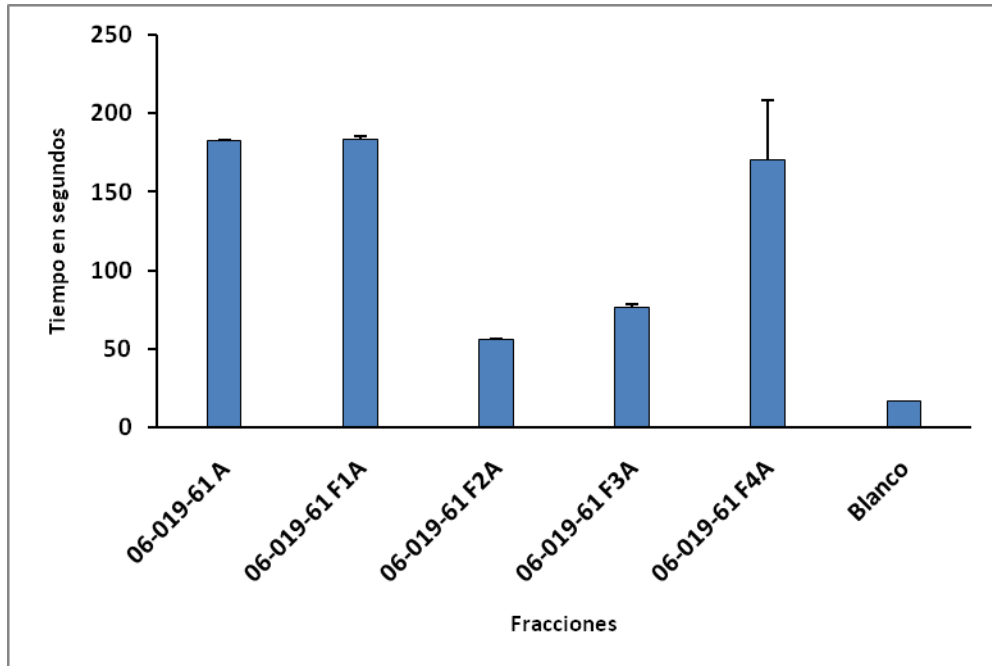


Figura 4. Se muestra el tiempo en segundos de la inhibición en la formación del coágulo sanguíneo en el ensayo de TP. La fracción 06-019-61 F1A presentó el mayor tiempo con 183.9 segundos.

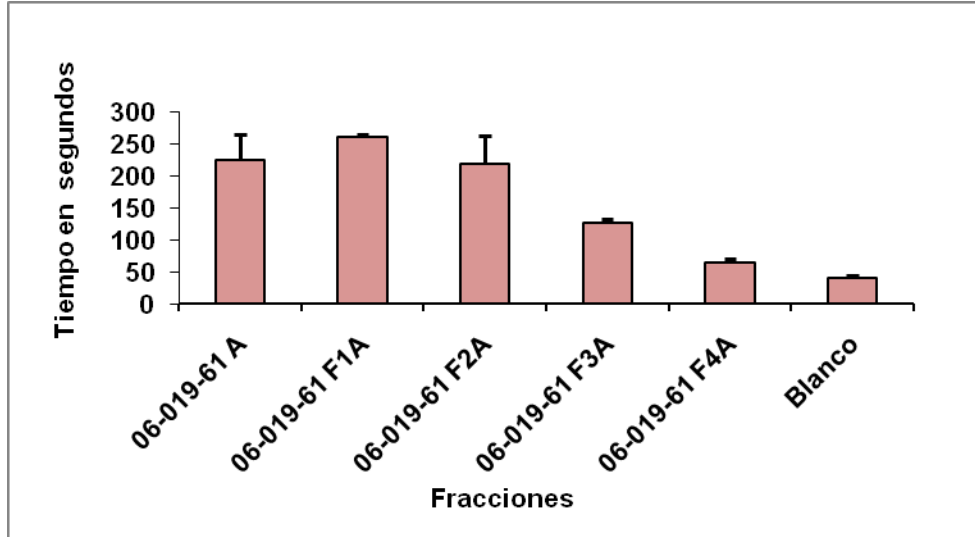


Figura 5. Se muestra el tiempo en segundos de la inhibición en la formación del coágulo, sanguíneo en el ensayo TTPa con plasma sanguíneo de hembras. La fracción 06-019-61 F1A fue mayor con 183.9 segundos.

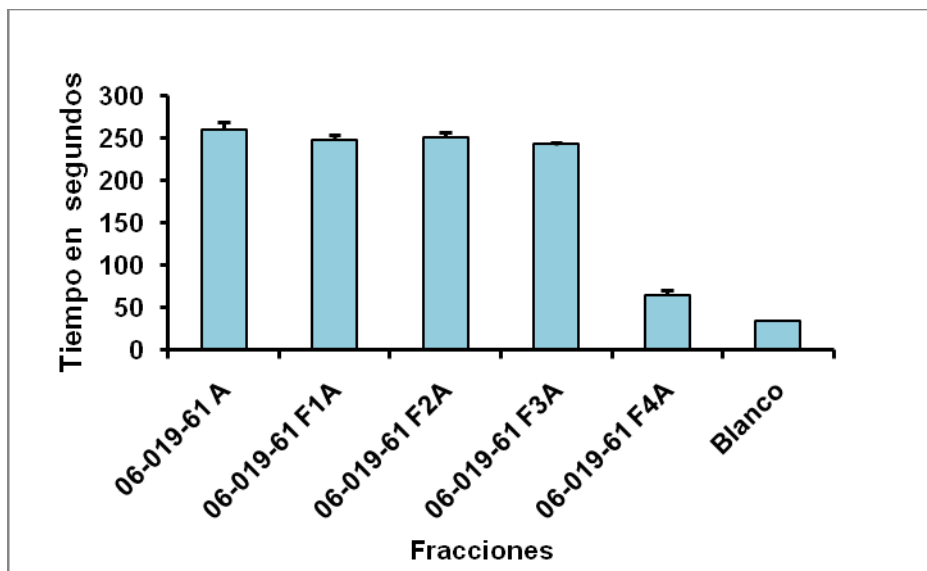


Figura 6. Se muestra el tiempo en segundos de la inhibición en la formación del coagulo, sanguíneo en el ensayo TTPa utilizando plasma sanguíneo de machos. La fracción 06-019-61 F1A fue mayor con 183.9 segundos.

## 6.2. Caracterización de química de los polisacáridos sulfatados

Como se puede observar en la figura 7, el espectro de resonancia magnética nuclear de protón  $^1\text{H}$  obtenido de la fracción 06-019-61 F1A, muestra una señal en 1.5 ppm típica de los protones del grupo metilo, así también se observa una señal a  $\delta$  3.3 debida al metanol que fue utilizado para la disolución de la muestra. La señal en tripletes que se encontró entre los 4.5 y 5 ppm podría deberse a la señal anomérica de  $\alpha$ -L-fucopiranosil.

Por otro lado, en la figura 8 se muestra el espectro de infrarrojo donde se observa la banda de los  $3330.9\text{ cm}^{-1}$  que es debida a la vibración del enlace O-H, mientras que las obtenidas entre  $1597.7$  y  $1407.2\text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a las vibraciones de enlaces del grupo carboxilo; la banda a  $1026.2\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de los enlaces del anillo de azúcar. La banda  $819.24\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la torsión de los enlaces éster sulfato así como la observada a  $1226\text{ cm}^{-1}$  corresponde a grupos sulfatos que puede corroborarse también con la banda a los  $570.81\text{ cm}^{-1}$ .

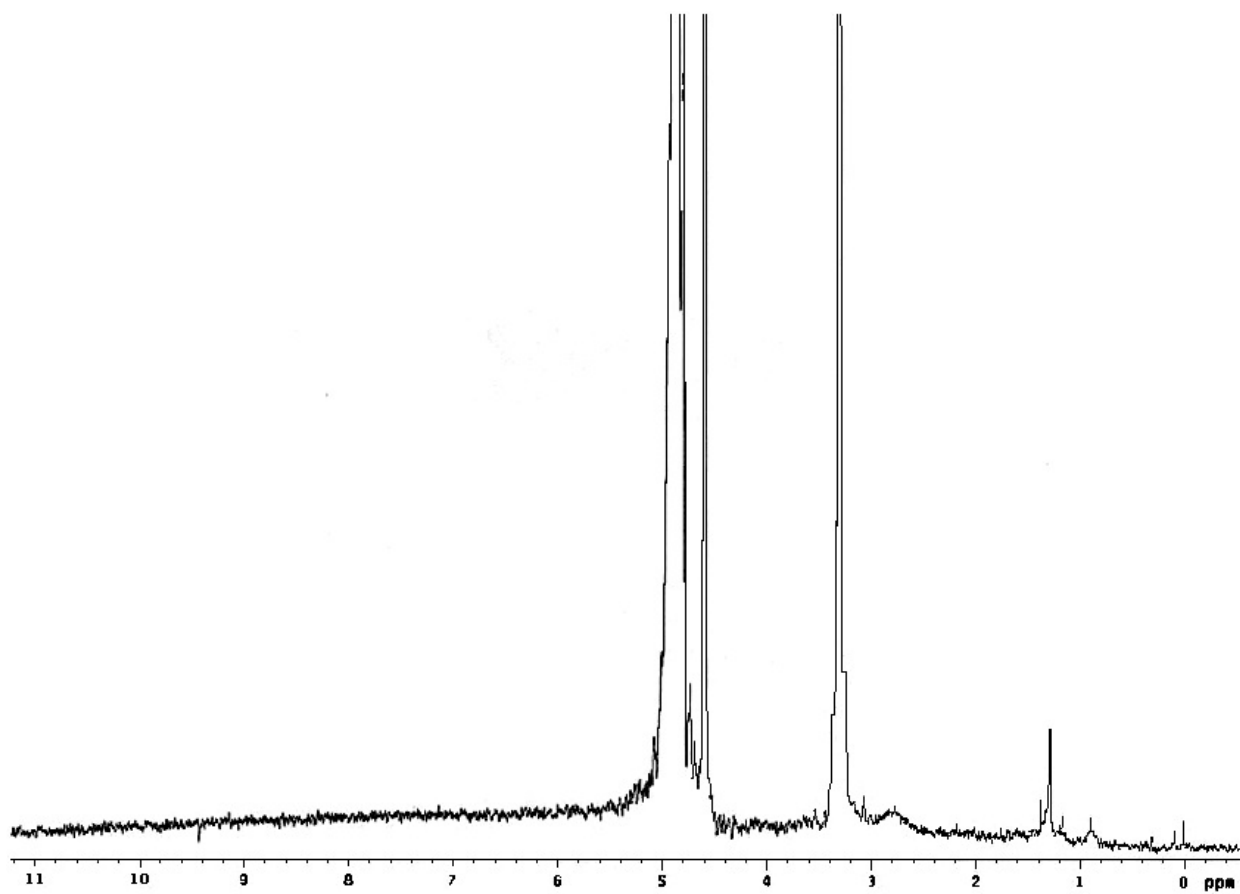


Figura 7. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón  $^1\text{H}$  de la fracción 06-019-61 F1A.

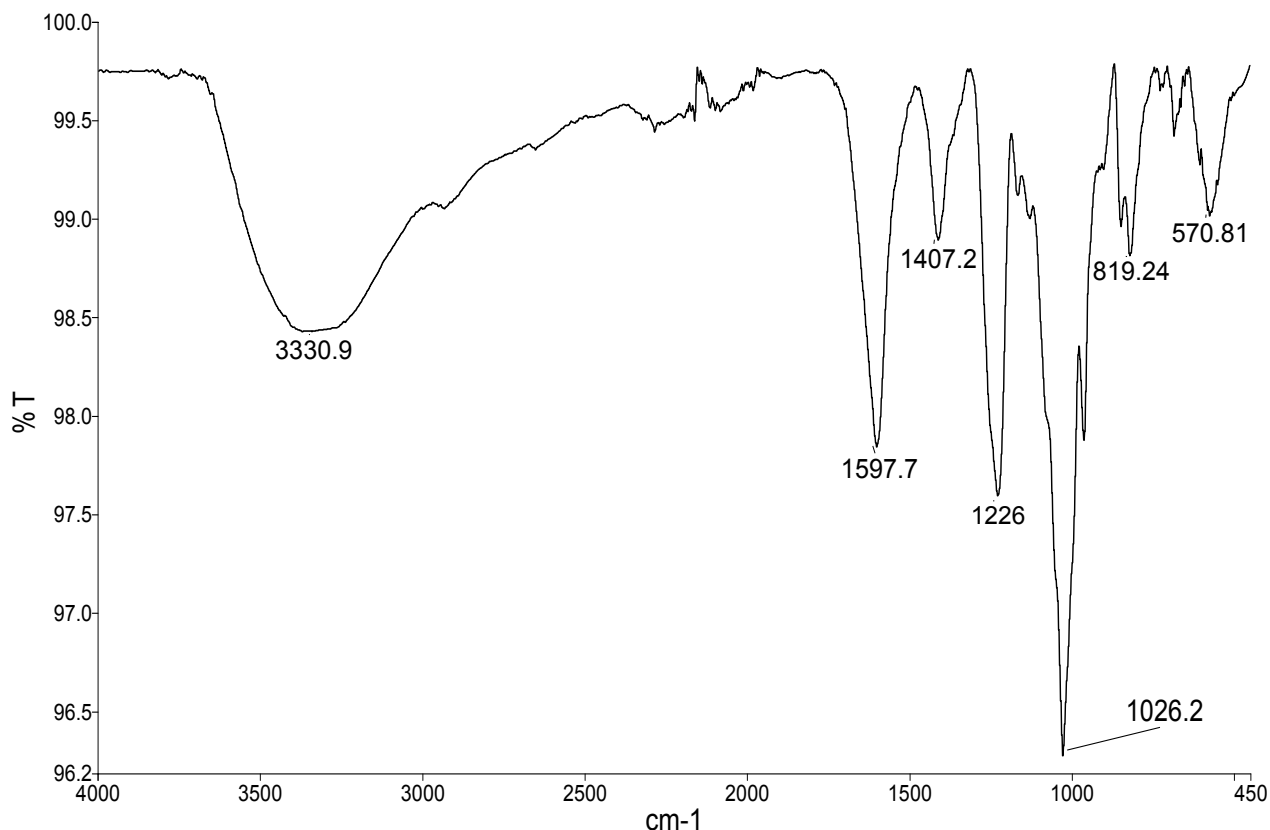


Figura 8. Espectro de infrarrojo de la fracción 06-019-61 F1A.

### 6.3. Análisis hematológicos

Al determinar la dosis de prueba, se obtuvo que 5 mg/kg inhibió el coagulo por 520 s, 2 mg/kg por 300 s y 0.5 mg/kg hasta 120 s; la dosis de 2 mg/kg de heparina inhibió el coagulo por 600 s por lo que dichas dosis se eligieron para las pruebas *in vivo*. Los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* para tiempos de protrombina (TP) en hembras se pueden observar en el anexo 3 y en el anexo 4 para los machos; los resultados de tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) para hembras y machos se observan en los anexos 5 y 6 respectivamente. A dichos datos se les aplico el método de Friedman y no se encontró diferencias significativas.

Por otro lado, los parámetros obtenidos en los análisis de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) se pueden observar en los anexos 7 al 11 para hembras y machos respectivamente; en cada uno de los anexos se encuentra la

fecha de toma de muestra de acuerdo al calendario establecido (Anexo 1) y los parámetros medidos.

En la tabla 1 se observan los valores de ji cuadrada ( $Xr^2$ ) obtenidos con método de Friedman, el cual determinó diferencias significativas en tres parámetros. Para los análisis de biometría hemática, el volumen globular medio (VGM) tuvo un valor de  $Xr^2$  igual a 13.29 ( $p= 0.0099$ ) en hembras y 11.68 ( $p=0.01$ ) en machos respectivamente. En los análisis de hemoglobina corpuscular media (HCM), se observó un valor de  $Xr^2$  igual a 12.24 ( $p=0.01$ ) para los machos. En los análisis de química sanguínea (SMAC 24), el valor de  $Xr^2$  para la glucosa sérica en machos fue igual a 13.12 ( $p=0.01$ ). En la misma tabla 1, los valores mayores de la media ( $\bar{X}$ ) para los análisis del volumen globular medio (VGM) se observaron en los tratamientos con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A y 2 mg/kg de heparina sódica tanto para machos y hembras; en los análisis de hemoglobina corpuscular media (HCM) el valor mayor de  $\bar{X}$  se observó en el tratamiento con heparina sódica en los machos y el tratamiento con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A aplicado a machos mostró los valores mayores de  $\bar{X}$  para glucosa sérica.

Tabla 1. Se observan los valores de la media ( $\bar{X}$ ) obtenidos para cada uno de los parámetros donde se encontró diferencias significativas con el análisis de friedman. Los números señalados en rojo son los valores más altos. También se pueden visualizar los valores de ji cuadrada ( $Xr^2$ ).

		Valores de $\bar{X}$					$Xr^2$	$p$
		5 mg/kg F1A	2 mg/kg F1A	0.5 mg/kg F1A	2 mg/kg Hep	S.S		
VGM	Hembras	47.01	56.18	62.81	62.91	55.42	13.29	0.0099
(fl)	Machos	49.85	57.97	61.92	61.05	61.90	11.68	0.01
HCM (pg)	Machos	20.93	24.71	25.15	26.34	25.13	12.24	0.01
Glucosa sérica (mg/dL)	Machos	125.58	103.18	132.20	97.27	105.12	13.12	0.01



#### **6.4. Aspectos físicos y morfológicos**

Los promedios de temperatura y humedad relativa fueron de 20.32°C y 64.46 RH respectivamente. Las hembras del grupo tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A presentaron alopecia en la mejilla derecha y los machos del grupo tratado con 5 mg/kg de 06-019-61 F1A y del grupo tratado con 2 mg/kg de heparina sódica mostraron agresividad (estrés), de tal manera que se tuvieron que colocar en cajas independientes a dos individuos de cada tratamiento mencionado.

#### **6.5. Análisis histológicos**

En tejido de corazón, se observó infiltración grasa en miocardio y pericardio principalmente, sin embargo también se visualizó infiltración grasa en tejido conectivo y fibroso del septo interventricular (Imagen 9-C y D). Dichas condiciones fueron notorias a partir del muestreo 4 (23 de Mayo del 2012) en los grupos de tratamiento con 5 mg/kg y 0.5 mg/kg de la fracción 06-019-61 F1 A. Así mismo, en todos los tratamientos se visualizó abundantes bacterias con células inflamatorias en ventrículo izquierdo (Imagen 9-A y B), derecho y en algunos casos dentro del atrio. Estas condiciones se encontraron también en los grupos que fueron inoculados con heparina sódica y solución salina.

Por otro lado, en las muestras de todos los grupos de tratamiento, incluyendo aquellos a los que se inyectó heparina y solución salina mostraron vacuolización del citoplasma de los hepatocitos del hígado (Imagen 10-A), y desde el primer muestreo (11 de Abril del 2012) se visualizó hiperplasia. Las células hiperplásicas se encontraron en la periferia de la zona portal o bien al borde de la vena central (Imagen 10-C y D). Cabe señalar que los sinusoides de los hepatocitos se visualizó anisocitosis y anisocariosis (Imagen 10-B).

Los túbulos proximales en la medula de riñón, se observaron con hemosiderina en todos los grupos de tratamiento, así como deformidad en la membrana de las células cúbicas que los conforman y vacuolización del citoplasma en las mismas (Imagen 11-A y B). De igual manera, los túbulos distales mostraron

vacuolización en el citoplasma de las células; en la zona de la corteza, los glomérulos se visualizaron dilatados (Imagen 11-A y B) y los túbulos colectores alargados, así como células hiperplásicas (Imágenes 11-C y 12-A). La papila presentó túbulos alargados, células con citoplasma vacuolizado y en algunos casos infiltración grasa (Imagen 12-B y C).

En pulmón, se observó infiltrado sanguíneo en alveolos y ductos alveolares tanto en hembras como machos de todos los tratamientos. Las células tenían una apariencia normal, sin embargo, en algunos casos se visualizó hemosiderina y macrófagos. Así mismo se encontró infiltración bacteriana en las venas e inserción grasa en el tejido de los alveolos; se observó hiperplasia a partir del muestreo 5 (6 de junio del 2012) específicamente en una muestra de pulmón en macho tratado con 2 mg/kg de 06-10-61.

De igual manera, en bazo se observó actividad fagocítica de eritrocitos en la pulpa blanca, y presencia de hemosiderina. En la pulpa roja hubo aumento de megacariocitos, por lo tanto fueron evidentes los linfocitos T y B. Así mismo, fue normal encontrar actividad hematopoyética. En cuanto a médula ósea, se observó infiltración grasa sólo en dos hembras de los tratamientos con 5mg/kg de 06-019-61 F1A y 2mg/kg de heparina sódica respectivamente, mientras que en los demás tratamientos no se visualizó anormalidad.

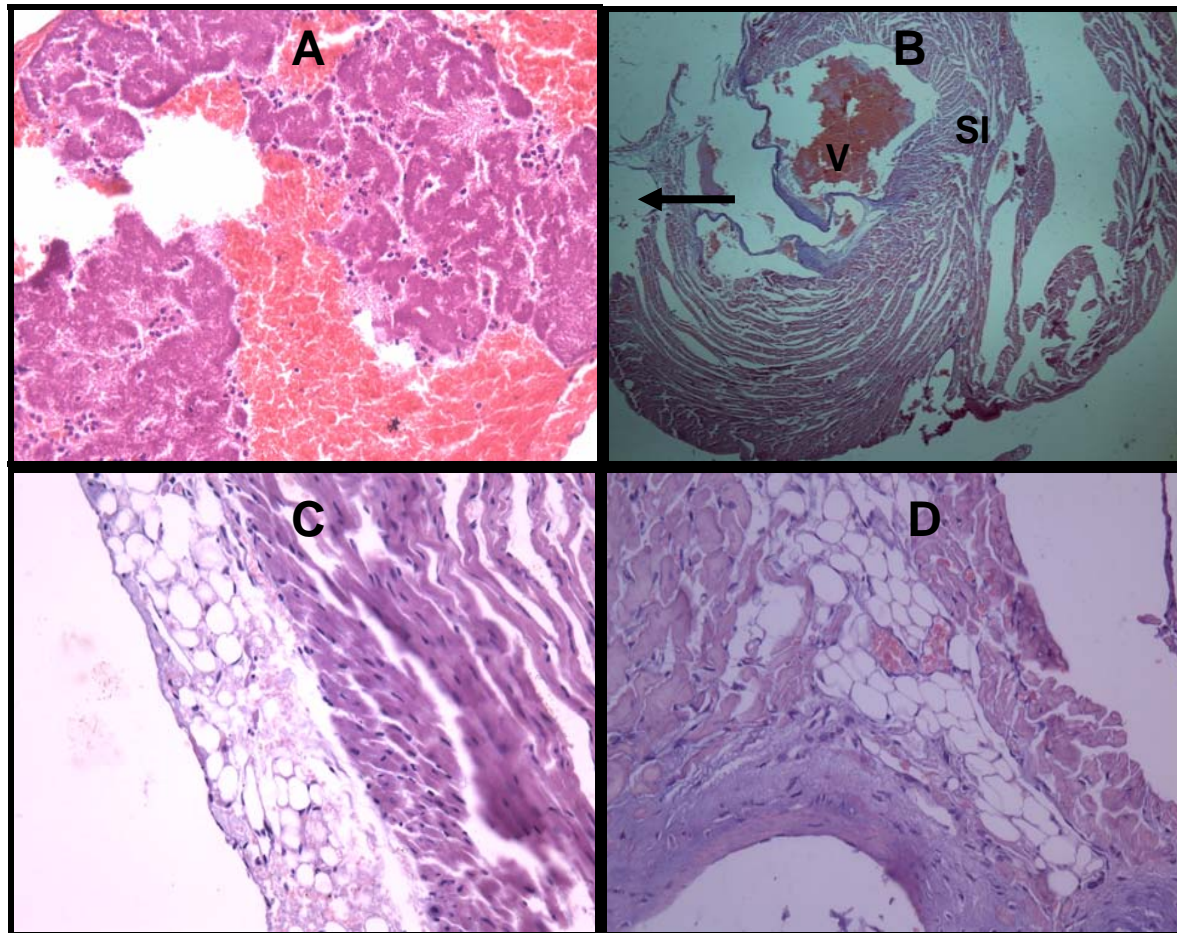


Imagen 9. Se observa la imagen ampliada A en objetivo 40x, donde la flecha de color negro muestra los eritrocitos e infección bacteriana en ventrículo del corazón, es una muestra de ratón macho inoculado con 5mg/kg de 06-019-61 F1A. En la imagen B se observa el septo interventricular (SI) y el ventrículo (V) a objetivo 4x. En la imagen C se observa inserción grasa en pericardio y tejido conectivo. En la imagen D también se observa inserción grasa en tejido conectivo. Ambas muestras pertenecen a hembras tratadas con 5mg/kg de 06-019-61 F1A. Las imágenes se obtuvieron a 40X.

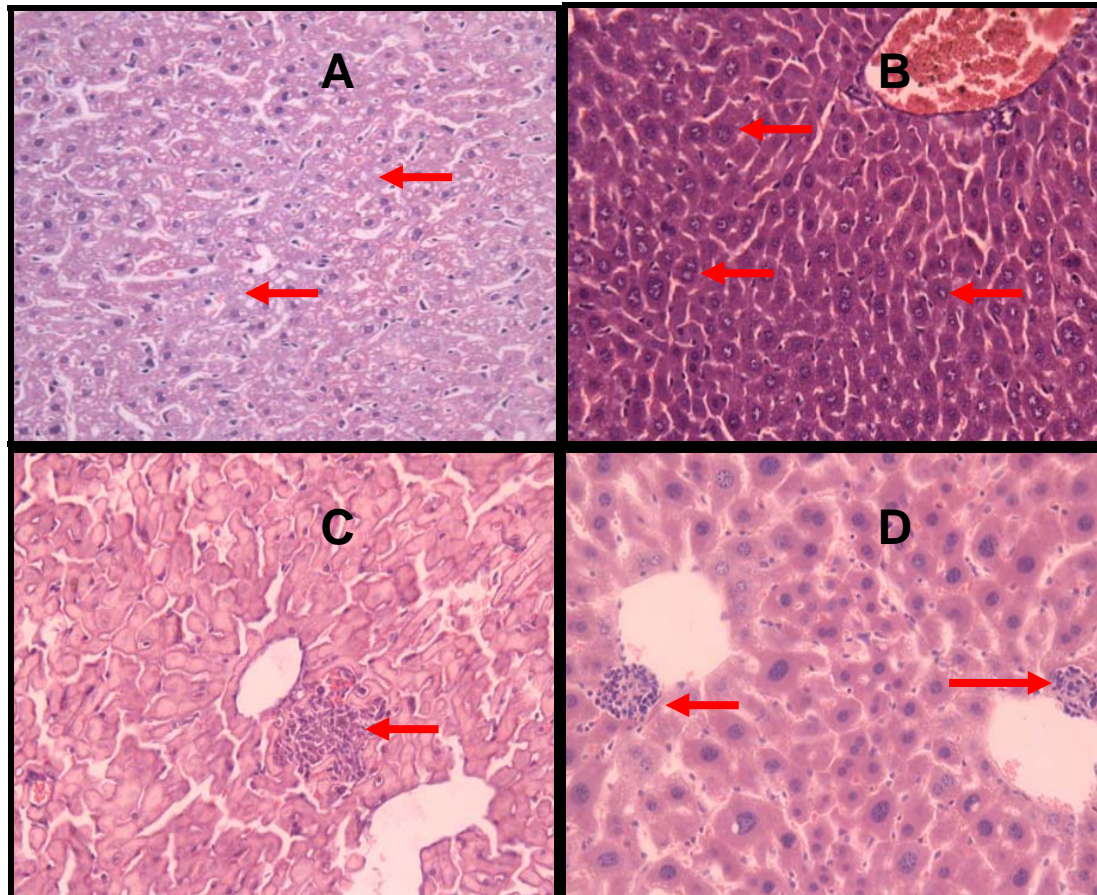


Imagen 10. Las flechas de la imagen A muestran el citoplasma vacuolizado en hepatocitos de ratón hembra, a la cual se aplicó el tratamiento de 2mg/kg de 06-019-61 F1A; en la imagen B se visualiza los hepatocitos del ratón hembra con tratamiento de 0.5mg/kg de 06-019-61 F1A. Es clara la deformidad de las células (anisocitosis y anisocariosis). En la imagen C la flecha roja indica la vena central con hiperplasia, esta es una muestra obtenida de hembra a la que se inoculó con solución salina. En la imagen D se de igual manera se observa hiperplasia en una muestra de macho al que se inyectó 5 mg/kg de 06-019-61 F1A. Todas las imágenes se obtuvieron a 40x

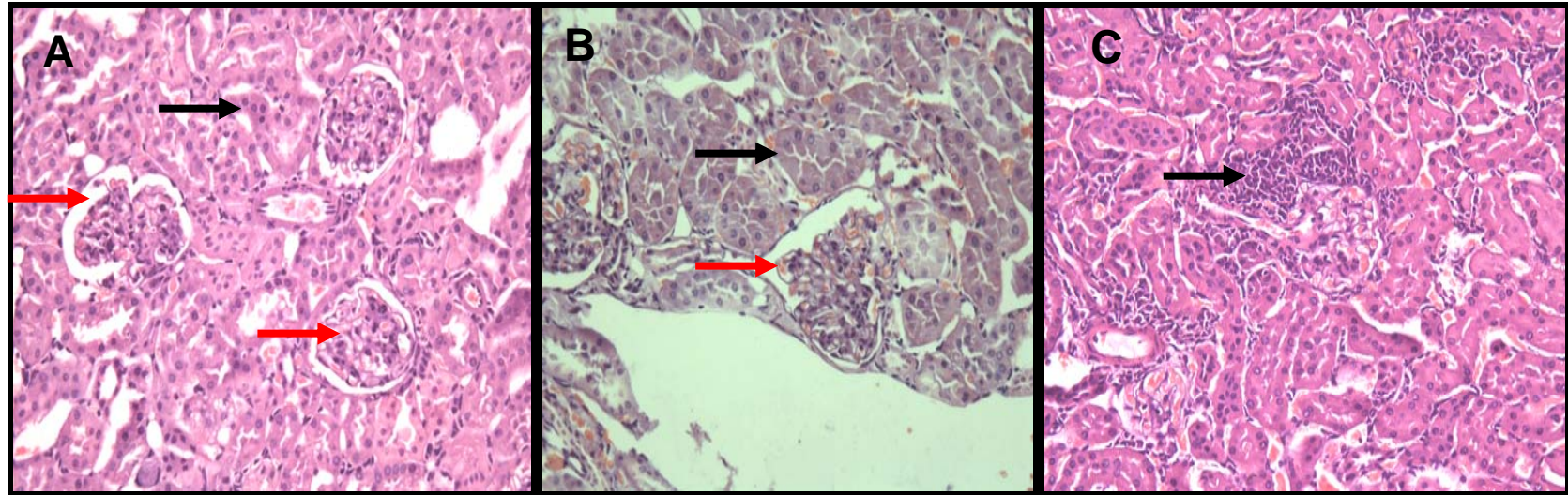


Imagen 11. Se observan glomerulos dilatados en la imagen A (flechas rojas) y túbulo proximales deformados en el riñón (flechas negras); la muestra se obtuvo de ratón hembra tratado con 5mg/kg de 06-019-61 F1A; de igual manera se observan los glomerulos del ratón macho con el mismo tratamiento (imagen B) . En la imagen C se observa hiperplasia alrededor del glomerulo en riñón, obtenido de ratón hembra tratada con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A.

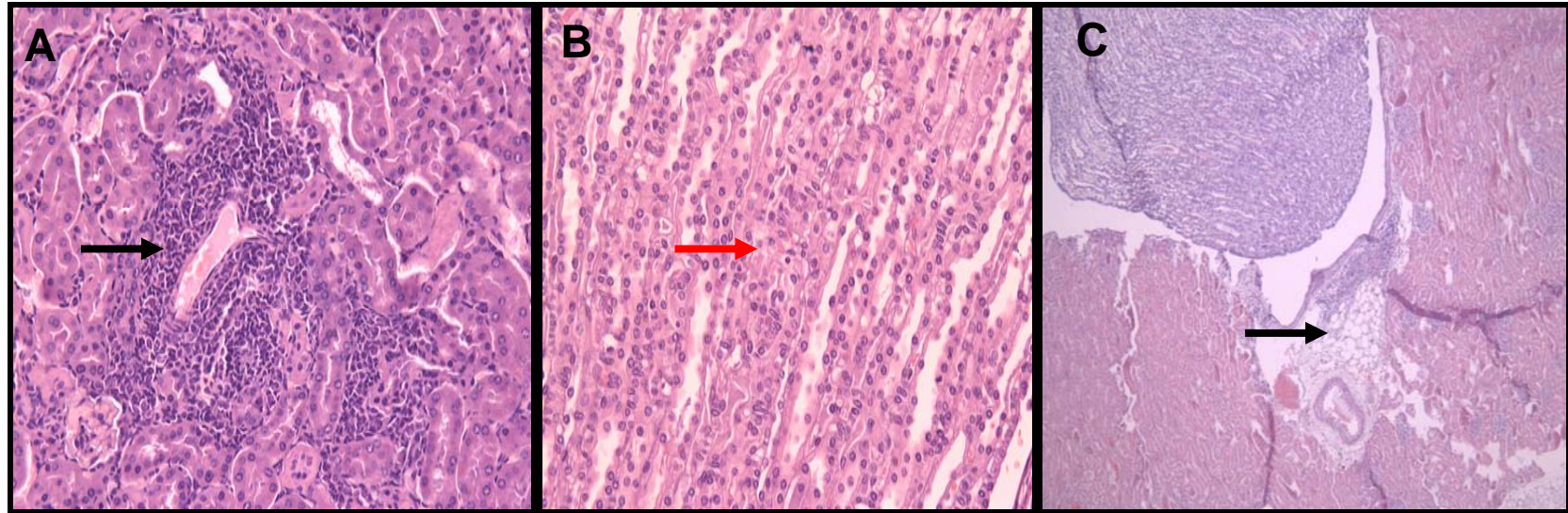


Imagen 12. la imagen A muestra hiperplasia entre los tubulos proximales y distales. La imagen B muestra inserción grasa en papila de hembra tratada con 2 mg/kg de heparina sódica y en la imagen C se observa vacuolizacion en citoplasma de los tubulos colectores (papila), en una muestra de macho tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A. Las imágenes se obtuvieron en 4 y 40x respectivamente.

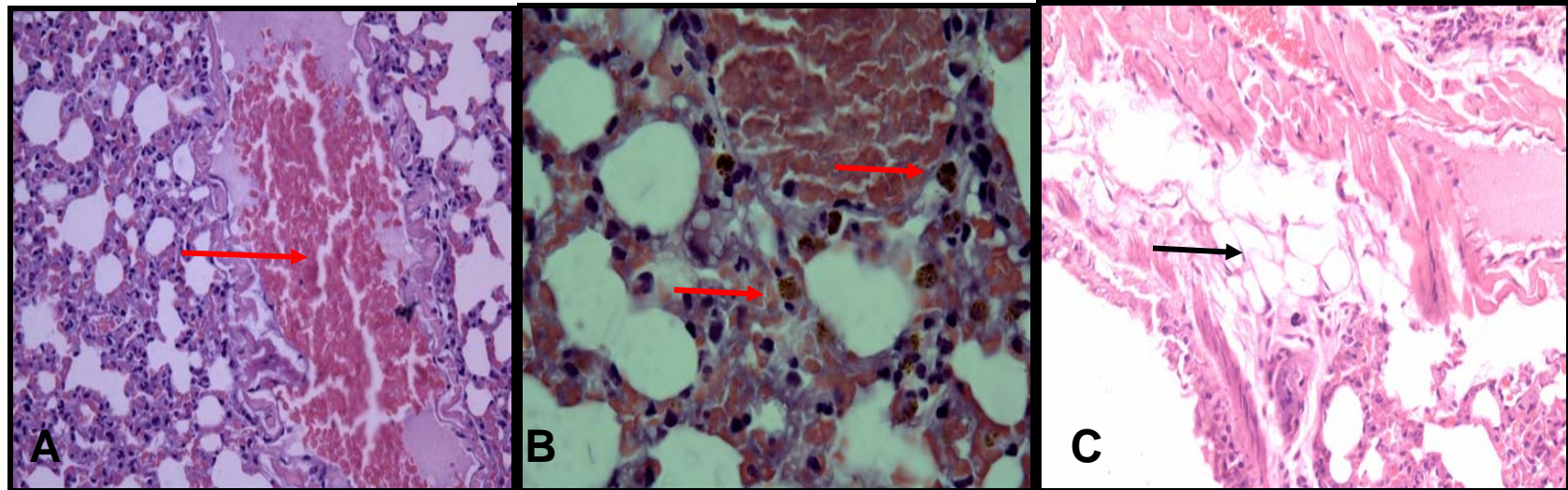


Imagen 13. Las flechas rojas de la imagen A muestran aumento sanguíneo en las venas del pulmón y el tejido proviene del raton hembra del tratamiento de 5mg/kg de 06-019-61-F1A; en la figura B se observan hemosiderina y eritrocitos en los alveolos, el tejido proveniente del raton macho con el mismo tratamiento. Las imágenes se obtuvieron a 40 y 100x respectivamente. En la imagen C se observa insercion grasa en pulmon de hembra tratada con 5mg/kg de 06-019-61 F1A (40x).

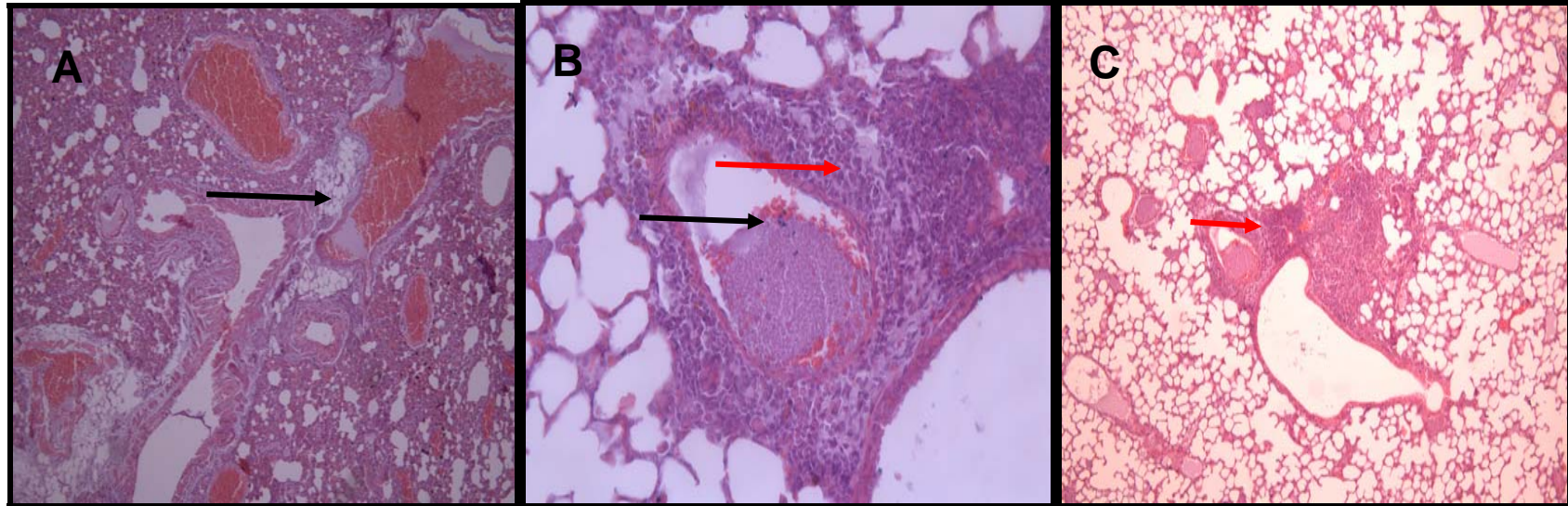


Imagen 14. Se observa infiltración grasa en tejido de raton macho tratado con 2 mg/kg de heparina (10x) en la imagen A. En la imagen B la flecha indica la infiltración bacteriana en vena de pulmón macho que fue tratado con 2 mg/kg de 06-019-61 F1A y al igual que la imagen C se observa hiperplasia (flechas rojas). Las imágenes se obtuvieron a 10 y 40 x.



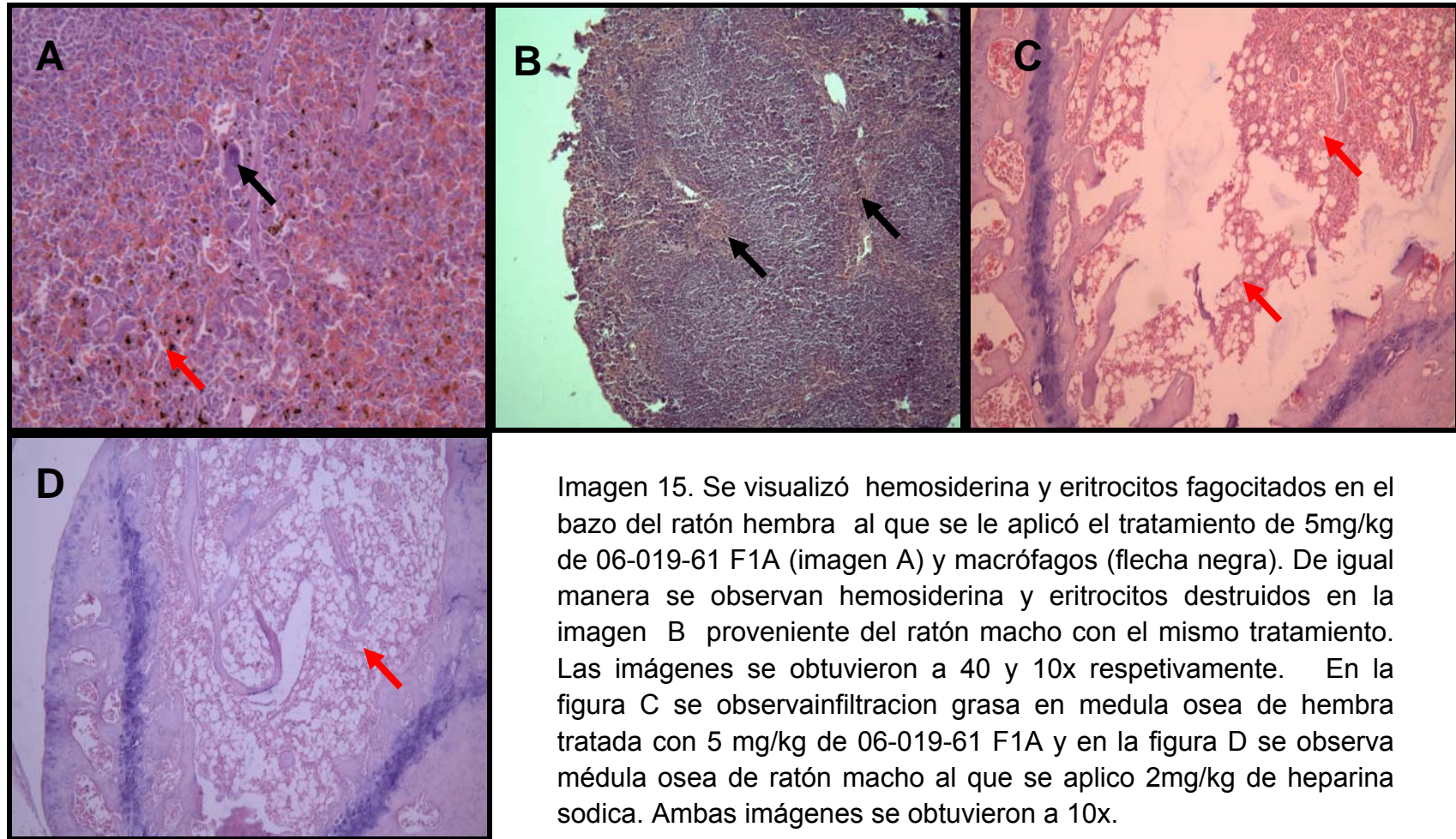


Imagen 15. Se visualizó hemosiderina y eritrocitos fagocitados en el bazo del ratón hembra al que se le aplicó el tratamiento de 5mg/kg de 06-019-61 F1A (imagen A) y macrófagos (flecha negra). De igual manera se observan hemosiderina y eritrocitos destruidos en la imagen B proveniente del ratón macho con el mismo tratamiento. Las imágenes se obtuvieron a 40 y 10x respetivamente. En la figura C se observainfiltracion grasa en medula osea de hembra tratada con 5 mg/kg de 06-019-61 F1A y en la figura D se observa médula osea de ratón macho al que se aplico 2mg/kg de heparina sodica. Ambas imágenes se obtuvieron a 10x.

## 7. Discusión

### 7.1 Actividad anticoagulante *in vitro* e *in vivo* y conformación estructural

Los polisacáridos sulfatados han sido altamente estudiados desde hace más de 50 años, probados para diferentes actividades biológicas y en distintos sistemas con mamíferos. En ellos se han visualizado su prometedor actividad anticoagulante (Pereira *et al.* 1999). Por mencionar algunos, De Lara *et al.* (2004) realizó ensayos de TTPA y TP en algas recolectadas en el Golfo y Caribe Mexicano encontrando que el alga parda *Lobophora variegata* inhibió la formación del coagulo por más de 10 minutos en ambas pruebas.

Así también, se encuentran los realizados por Muñoz-Ochoa (2006 y 2009) y Aguilar-Resendiz (2010) con algas del Pacífico Mexicano y Golfo de California, dónde el primero encontró actividad anticoagulante *in vitro* del alga parda *Eisenia arborea* incrementando el TTPA y TP control a más de 300 s; el segundo autor menciona que en sus análisis de TP, el alga parda *M. pyrifera* presentó el mayor tiempo de coagulación de 105 s y TTPa con 300 s.

Al comparar tales resultados con los obtenidos en el presente estudio, se determinó que el tiempo de inhibición de la fracción 06-019-61 F1A *in vitro* fue menor con 183.9 s en la prueba de TP (Figura 4), sin embargo, en la prueba de TTPa se obtuvieron valores semejantes a los reportados anteriormente, con tiempos de 260.4 y 247.2 s en plasma sanguíneo de ratones hembra y macho respectivamente (Figuras 5 y 6). No obstante, otros análisis realizados a partir de algas que no pertenecen a las costas mexicanas, como los de Kuznetsova y colaboradores (2003) que analizaron fucoïdan extraído de *Fucus evanescens* el cual inhibió la formación del coagulo sanguíneo a  $150 \pm 54.3$  s en TTPa así como Silva y colaboradores (2005) muestran heterofucanos de *P. gymnospora* con valores de mayores a 240 s en la misma prueba.

Por otro lado, en los anexos 5 y 6 se puede observar los valores de tiempos de coagulación en el ensayo de TP y en los anexos 7 y 8 los de TTPa determinados *in vivo*; al inicio de los experimentos se encontró inhibición del coágulo sanguíneo en

los primeros quince días de prueba, no obstante, a partir del muestreo del 25 de abril del 2012 los valores se mostraron normales con 13 s para TP y 45 para TTPa en hembras y machos con los tratamientos de la fracción 06-019-61 F1A, heparina sódica y solución salina. A pesar de que la actividad no se mantuvo durante los tres meses de prueba, la hipótesis fue probada ya que hubo actividad anticoagulante en los tratamientos con la fracción 06-019-61 F1A semejantes a los observados con heparina sódica.

Lo anterior constata con los análisis reportados por Kim y colaboradores (2010) quienes no encontraron modificaciones en los tiempos de coagulación en el experimento (realizado por un mes) e indicaron esto como un paradigma en su análisis, sin embargo, Gideon & Rengasamy (2008) realizaron el análisis de fucoidan extraído de *Cladosiphon okamuranus* durante tres meses encontrado que el fucoidan aumenta el tiempo de coagulación conforme se aplica una dosis mayor. Dichos autores mencionan que el efecto de la actividad anticoagulante depende del grado de sulfatación y el tamaño de la molécula.

Muchos de los estudios sobre la actividad anticoagulante en los polisacáridos sulfatados hablan de la relación entre la cantidad de sulfatos que contienen y su posición en la estructura molecular de los monosacáridos; generalmente asocian un alto contenido de grupos sulfato con una alta actividad anticoagulante en los fucoidanos crudos, sin embargo, el incremento entre la relación del anticoagulante con la antitrombina pueden decrecer gradualmente cuando aumentan los grupos sulfato en los fucanos (Li *et. al.*, 2008).

Por otro lado, la estrecha relación que se genera entre el fucoidan y la antitrombina está ampliamente investigada; Kuznetsoba y colaboradores (2003) realizaron ensayos con el fucoidan extraído de *Fucus evanescens* encontrando que no tiene actividad anticoagulante en el sistema de coagulación cuando se ha purificado fibrinógeno y la antitrombina III está ausente. Así mismo, el fucoidan produce un efecto anticoagulante dependiente de la dosis, similar a la heparina. Los cuatro grupos sulfato vinculados a la glucosamina en la heparina y su escisión, disminuye significativamente su actividad (Guerra-Rivas *et. al*, 2010).

Por otro lado, para la aplicación de la fracción 06-019-61 F1A se realizaron soluciones madre para tener la misma concentración de polisacáridos durante los tres meses de tratamiento; podría pensarse que la utilización de una sola solución madre por dosis realizaría una modificación de la estructura molecular del polisacárido en la fracción y por ende en la actividad biológica, sin embargo Guetta y colaboradores (2003) mencionan que no existe transición conformacional para un polisacárido en solución, sean cuales sean las condiciones. Así mismo, De zoysa y colaboradores (2008) mencionan que la fermentación en los polisacáridos suelen aumentar la actividad anticoagulante de los extractos.

Es claro que existen otros factores que intervienen en la potencialidad de la actividad anticoagulante tales como el proceso de extracción, la composición estructural del polisacárido, la temporada de recolecta del alga y las condiciones climáticas del sitio donde fue tomada (Silva *et. el*, 2005). Los polisacáridos neutrales son comúnmente obtenidos con agua a temperatura ambiente, mientras que los polisacáridos de bajo peso molecular y de alto peso molecular son extraídos con agua fría y agua caliente más allá de los 90°C respectivamente (Shanmungan & Mody, 2000).

El procedimiento para la obtención de los polisacáridos y fraccionamiento del extracto de *M. pyrifera* detallado en el punto 5.2 fue determinado en base a los estudios realizados por Aguilar-Resendiz (2010), quien estableció que la extracción de polisacáridos a 55°C a partir de *M. pyrifera* mostró la mayor actividad. Las eluciones con NaCl debían generar mayor concentración de polisacáridos conforme mayor fuese la composición molar (Lancheros *et. al.* 2006; Orozco *et. al.*, 2010), no obstante como se observa en las figuras 3, 4 y 5 la fracción que presentó rendimiento y mayor actividad anticoagulante fue 06-019-61 F1A obtenida solo con agua destilada.

Al realizar la extracciones con DEAE-celulosa se suelen obtener compuestos anticoagulantes que muestran propiedades metacromáticas relativamente altas, específicamente en aquellos que contienen un gran número de grupos sulfato o grupos aniónicos; las moléculas con menores grupos sulfato exhiben baja actividad metacromática y dicha propiedad indica la complejidad estructural del polisacárido

aislado (Athukorala *et. al.*, 2006; De Zoysa *et. al.*, 2008). Es posible que la fracción 06-019-61 F1A contenga actividad metacromática alta debido a la actividad mostrada *in vitro*.

Otra causa de la disminución en la actividad anticuagulante podría ser que la heparina es capaz de interactuar con enzimas, citocinas y proteínas de la matriz extracelular; así también se ha identificado algunos oligosacáridos que tienen interacción con la superficie celular, específicamente con las selectinas. Las selectinas son un grupo de lectinas que se encuentran en los leucocitos, plaquetas y células endoteliales. Las selectinas interactúan con oligosacáridos agrupados en las superficies celulares durante la rotación de leucocitos antes de la adhesión firme, extravasación y migración a un sitio de infección (Masayuki & Katsuaki 1998; Berteau & Mulloy, 2003).

El fucoidan también puede mimetizarse como un ligando en las L- o P-selectinas; es posible que los polisacáridos presentes en la fracción 06-019-61 F1A hayan interactuado con los leucocitos activando los macrófagos y el efecto fagocítico ante la presencia de infección (Imágenes 9 A-B y 14) (Texeira & Hellewell, 1997; Berteau & Mulloy, 2003); De la torre- López (2010) determinó actividad inmunoestimulante en tres fracciones obtenidas a partir de *M. pyrifera* al inyectarlas en ratones Balb/c y produjeron algunos factores inmunológicos (TNF- $\alpha$ , IL-6, ON) en líneas celulares RAW 264.7.

En cuanto a la estructura molecular, se conoce que los polisacáridos son conformados a partir de monosacáridos que tienen diferentes tipos de enlaces en distintas posiciones del anillo carbónico, ya sea formando la cadena lineal o polímeros ramificados. Otras modificaciones tales como alquilación, fosforilación, y sulfación proporcionan una complejidad estructural adicional y actividades propias de los compuestos (Morya *et. al.*, 2012). Además de los grupos sulfato, los fucanos pueden estar conformados por xilosa, manosa, galactosa, glucosa, ácido glucorónico, entre otros (Shanmungam & Mody, 2000; Duarte *et. al.*, 2001).

Según Duarte y colaboradores (2001) y Li y colaboradores (2008) el principal constituyente de los fucanos extraídos de *M. pyrifera* suelen ser fucosa y galactosa en una proporción 18:1, mientras que Chandia y colaboradores (2005) mencionan

que los fucanos producidos por *M. pyrifera* pueden llegar a contener fucosa, galactosa y xilosa en una proporción 36:2:1. No obstante, la heterogeneidad de los polisacáridos sulfatados hace difícil la determinación de la estructura molecular y algunas herramientas como la resonancia magnética nuclear (NMR) brinda la oportunidad de inferir la conformación (Rocha *et. al.*, 2005).

En la figura 7 se observa el NMR de protón  $^1\text{H}$  obtenido a partir de la fracción 06-019-61 F1A, donde la señal en  $\delta$  1.5 ppm típica de los protones del grupo metilo y la señal a  $\delta$  3.3 puede atribuirse al metanol deuterado que fue utilizado para la disolución de la muestra (Pretchs *et. al.*, 2009). La señal en tripletes que se encontró entre los 4.5 y 5 ppm podría deberse a la señal anomérica de  $\alpha$ -L-fucopiranosil (Mulloy *et al.*, 1994; Pereira, 1999; Shiroma *et al.*, 2008). Este espectro también muestra características semejantes al reportado por Chandia y colaboradores (2005), quienes obtuvieron una fracción (F-1) que mostró protones anoméricos conectados en las regiones H-1 a H-4, protones de metilo en H-5 debido a patrones de sustitución de residuos de fucosil y asignaciones que indican una mayor proporción de residuos de fucosas sulfatadas en las posiciones O-2 y O-4. También mencionan que el espectro NOE de dicha fracción confirmó las correlaciones entre H-1 y H-3 que podrían indicar uniones de fucosa 1 $\rightarrow$ 3.

Por otro lado, la figura 8 también muestra el espectro de infrarrojo de la fracción 06-019-61 F1A donde fue evidente la presencia de grupos sulfato por las bandas observadas a 570.81 y 1226  $\text{cm}^{-1}$  así también grupos éster sulfato a 819.24  $\text{cm}^{-1}$  que podrían tener una posición ecuatorial en los C-2 y C-3 de los residuos de fucosa; estos resultados concuerdan con lo reportado para heterofucanos en *Padina gymnospora* e *Eisenia arborea* (Silva *et.al.*, 2005; Muñoz-Ochoa *et. al.*, 2009). Lo anterior también se observó en la mezcla de polisacáridos obtenidos de *M. pyrifera* por Aguilar-Resendiz (2010), así como una similitud con las bandas encontradas a los 3330.9  $\text{cm}^{-1}$  (enlace O-H), 1597.7 y 1407.2  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces COOH) y 1026.2  $\text{cm}^{-1}$  (anillo de azúcar; Figura 8).

## 7.2. Análisis hematológico e histológico

La experimentación animal *in vivo* constituye una parte fundamental en la fase preclínica para el desarrollo de nuevos medicamentos, lo que precede a la aplicación futura en los humanos; el seguimiento de la incorporación y permanencia del producto en el organismo que lo recibe es muy necesario para determinar la efectividad del posible fármaco y la existencia de toxicidad. Los estudios hematológicos suelen proporcionar información acerca de la patología y fisiología de los elementos celulares en la sangre, y si algunos de sus componentes se ven afectados como: eritrocitos (células rojas), leucocitos (células blancas) y trombocitos (plaquetas; Hedrich & Bullock, 2004; Dávila-Giráldez & Vidal-Romero 2007).

En el presente estudio se determinó la biometría hemática y la química sanguínea de 24 elementos (SMAC 24) para elucidar si los polisacáridos de la fracción 06-019-61- F1A tenían un efecto tóxico en los organismos de la cepa C-D1 de *Mus musculus*; como se observa en el punto 6.5, se realizó un análisis de Friedman para determinar si había diferencias significativas en cada parámetro de química sanguínea y biometría hemática entre los tratamientos, encontrándolas sólo en tres de ellos: Volumen globular medio (VGM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y glucosa sérica (Tabla 1).

Al determinar los valores de las medias en cada parámetro y tratamiento, se encontró que el tratamiento con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A y 2 mg/kg de heparina mostraron un comportamiento semejante ya que los valores de media para el análisis de VGM fueron de 62.81 y 62.91 fl en hembras y 61.9 y 61.05 fl en los machos respectivamente. El grupo tratado solo con solución salina (blanco negativo) mostró valores de media menores a los anteriores para ambos sexos (Tabla 1). Hedrich & Bullock (2004) establecen que los valores normales para VGM en ratón es de 52.1 fl mientras que Mathers y colaboradores (2008) mencionan que la media del volumen globular normal para ratón es de 45. 5 fl. Por otro lado, los laboratorios Charles River (2012; <http://www.criver.com/en-US/Pages/home.aspx>) determinaron el valor de VGM para la cepa CD-1, estableciendo que la media es 56.6 para hembras y 55.8 fl en machos.

Los valores altos de VGM suelen indicar daño hepático y como se observa en la imagen 10 es evidente que el hígado presenta deformación en sinusoides y hepatocitos. Lo anterior puede deberse al envejecimiento de los organismos, ya que al aumentar la edad, se producen una perturbación en el complejo de enzimas hepáticas generando alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. La susceptibilidad de los órganos al efecto tóxico también aumenta con la edad así como la alteración celular y neoplasias (hiperplasias en imágenes 10, 11-C, 12-A y 14 B-C) (Booth & McDonald, 1988; Hedrich & Bullock, 2004).

Las lesiones no neoplásicas presentes en ratones de edad son las necrosis coagulativas, la inflamación subaguda, cambios grasos, los hepatocitos apoptóticos (manifestado en forma de glóbulos acidófilos), depositación de pigmentos (lipofucina, hemosiderina y bilis), hipertrofia hepatocelular, hepatocitomegalia, anisocitosis y anisocariosis. Se observó hemosiderina en los alveolos del pulmón (imagen 13-B), en tejido de bazo (imagen 15-A), lo cual pudiera deberse al proceso denominado hemosiderosis generado por la pigmentación anormal del hierro. Lo anterior se presenta cuando hubo una hemorragia en las cavidades corporales o tejidos; clásicamente se establece una asociación con rotura excesiva de hematíes, como suele observarse en la anemia hemolítica (Hedrich & Bullock, 2004).

Siguiendo con lo encontrado en biometría hemática, para glucosa sérica, el valor de la media para machos fue de 132.20 mg/dL tratados con 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A; este valor es alto en comparación con los grupos a los que se inyectó solución salina y heparina sódica (blancos negativo y positivo). Mathers y colaboradores (2008) establecen que el rango normal de glucosa sérica está entre 65-175 mg/dL y los laboratorios Charles River (2012; <http://www.criver.com/en-US/Pages/home.aspx>) determinaron las medias en condiciones normales como 218 mg/dL para hembras y 232 mg/dL en machos por lo cual los rangos se mantienen semejantes.

Así también, se observaron diferencias significativas en la hemoglobina corpuscular media (HCM), siendo el tratamiento de 2 mg/kg de heparina sódica el que presentó mayor valor de la media con 26.34 pg en machos y el tratamiento de 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A presentó un valor de media semejante de 25.15 pg para el mismo sexo. Es notorio que el grupo tratado con solución salina también mantuvo



elevados los valores (tabla 1). En los reportes de Hedrich & Bullock (2004) el valor normal de HCM es 16.5 pg mientras que los laboratorios Charles River (2012; <http://www.criver.com/en-US/Pages/home.aspx>) determinaron que la media es de 15.5 y 15.2 para hembras y machos de la cepa CD-1 respectivamente (en condiciones sin ningún tratamiento).

Cabe señalar que los parámetros obtenidos por los autores antes mencionados y los de este estudio estaban bajo distintos márgenes ambientales (temperatura, presión atmosférica, humedad relativa) además de que la toma de la muestra sanguínea, el aparato donde se analizó y el tiempo que transcurrido hasta su análisis fueron distintos. Según Mira & Mathias (1999) el HCM en las hembras de *Mus spretus* suele aumentar 19.5 pg en primavera y 20.1 pg en machos durante el verano, esto a causa de la temperatura, estado reproductivo, condiciones de luz y humedad.

En el presente estudio, el promedio de temperatura y humedad relativa fueron de 20.32°C y 64.46 RH respectivamente, siendo las condiciones adecuadas; es posible que el ciclo reproductivo (ciclo estral) pudiere tener efecto ya que Julian y colaboradores (2001) mencionan que la heparina y el heparan sulfato pueden interactuar con proteínas ribosomales durante el ciclo estral, lo cual podría ser semejante con los polisacáridos sulfatados de la fracción 06-019-61 F1A.

Por otro lado, según Cris (2007) la solución salina normal isotónica (0.9%) no es capaz de crear desequilibrios en los electrolitos, sin embargo, contiene altas cantidades de sodio y cloruro en comparación con los fluidos corporales y puede dar lugar a la acidosis metabólica si la inyección de solución es agresiva; la severidad de la acidosis es proporcional al volumen de solución salina que se infunde y genera deficiencia renal y cambios en la presión arterial.

Cuando la presión arterial se ve afectada, las proteínas plasmáticas aumentan la presión osmótica en la vascularidad creando una afluencia de líquido en el espacio intersticial. La disminución del volumen circulante y la hipotensión también desencadenan sodio y la conservación de agua por los riñones a través de disminución de la producción de orina; el incremento de orina causa la constricción de las arterias renales reduciendo el flujo de sangre al riñón, a su vez, disminuyendo

de este modo la reducción de la filtración y de salida. Esto podría explicar la presencia de hemosiderina, deformidad en los túbulos proximales y distales así como dilatación de los glomérulos (imagen 11) (Cris, 2007).

Es importante señalar que la agresiva inoculación de solución salina puede dar también como resultado edemas en los tejidos, afectar a la función cardiovascular, aumentar la oportunidad para la translocación bacteriana (Imágenes 9 A-B y 14-B), la dilución de los factores de coagulación, activación de los neutrófilos (Imagen 15 A-B) y deficiencias hepáticas (Cris, 2007). Los daños en el hígado por la aplicación de solución salina suelen producirse en el metabolismo del lactato, específicamente en la glucogénesis y la oxidación, por que se observan cambios grasos en los tejidos (imágenes 9 C-D, 10, 12 B-C, 13 C, 14 A y 15 C-D).

Por último, Li y colaboradores (2004) evaluaron el archaran sulfato y no observaron daño en el sistema del organismo, Kim y colaboradores (2010) también llevaron a cabo ensayos *in vivo* con fucoidan de *Undaria pinnatifida* encontrando que este no tuvo efecto toxico en los órganos al igual que los análisis de Chung y colaboradores (2010); la toxicidad del fucoidan o sus derivados ya ha sido reportada en varios análisis, sin embargo en este estudio la presencia las mismas condiciones histopatológicas en todos los grupos de tratamiento, incluyendo aquellos que solo se inocularon con solución salina, sugieren que la toxicidad observada no es causada por la fracción 06-019-61 F1A.

## 8. Conclusiones

Se probó la hipótesis al determinar que la fracción 06-019-61 F1A obtenida del extracto acuoso mostró actividad anticoagulante *in vitro* e *in vivo* durante el tratamiento prolongado sin generar efectos secundarios.

Se observó que la fracción 06-019-61 F1A del extracto acuoso de *M. pyrifera* fue la que inhibió el coagulo por mayor tiempo con 183.9s en TTP y 260.4s para ratones hembra y 247 s para machos en la prueba de TTPa.

En las pruebas de actividad anticoagulante *in vivo*, la dosis de 0.5 mg/kg de la fracción 06-019-61 F1A fue similar a la actividad de 2mg/kg de heparina sódica durante 15 días de tratamiento y no generó efectos secundarios ya que las patologías observadas en riñón, hígado, corazón y pulmón también se observaron en el grupo inoculado solo con solución salina.

El tratamiento de 0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A tuvo valores de media ( $\bar{x}$ ) semejantes al tratamiento de 2mg/kg de heparina sódica en el parámetro de VGM tanto para hembras como para machos.

La caracterización parcial de los polisacáridos en la fracción 06-019-61 F1A por la técnica de IR determinó que estos contienen características semejantes a los heterofucanos extraídos de *Eisenia arborea* y *Padina gymnospora* evidenciando la presencia de los grupos sulfato responsables de la actividad anticoagulante. Así mismo, el espectro de NMR dilucidó la posible presencia del  $\alpha$ -L-fucopiranosil.

## **9. Recomendaciones**

El monitoreo de la excreción de orina y eses es necesario para determinar el porcentaje de eliminación de los polisacáridos; regular el consumo de alimento y realizar la bromatología de los mismos.

Se debe realizar la determinación de azúcares totales en las fracciones obtenidas, con ello se tendrá una idea más clara de la composición estructural monomérica.

Es necesario llevar a cabo el perfil hormonal en hembras para conocer el ciclo estral con seguridad; esto también debe realizarse en machos para establecer el nivel de estrés y comportamiento territorial.

Se requiere que se aumente el número de réplicas para cada parámetro en las mediciones de los análisis en biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24).

El agua destilada podría ser un mejor diluyente para las fracciones de polisacáridos en lugar de solución salina inyectable y así disminuir el posible efecto de hidratación excesiva en las células durante la inoculación.

## 10. Bibliografía citada.

- Aguilar–Resendiz, G. 2010. Extracción y caracterización parcial de polisacáridos solubles en agua con actividad anticoagulante a partir de cuatro especies de algas cafés. *Tesis de Ingeniería Bioquímica*. Instituto Tecnológico de La Paz. México. 60 p.
- Albuquerque, I.R.L., K.C.S. Queiroz, L.G. Alves, E.A. Santos, E.L. Leite & H.A.O. Rocha. 2004. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulante activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 167-171.
- Athukorala, Y., K.W. Jung, T. Vasanthan & J.Y. Jeon. 2006. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Eklonia cava*. *Carb. Pol.* 66:184-191.
- Berteau, O. & B. Mulloy. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. 13(6):29-49.
- Barros Gomes-Camara, R., L. Silva-Costa, G. Pereira-Fidelis, L.T. Duarte Barreto-Nobre, N. Dantas-Santos, S. Lima-Cordeiro, M. Santana Santos-Pereira Costa, L. Guimaraes-Alves & H.A. Oliveira-Rocha. 2011. Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. *Mar. Drugs*. 9:124-138.
- Cesta, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* 34:455-565.
- Chandia, N.P., B. Matsuhira, J.S. Ortiz & A. Mansilla. 2005. Carbohydrates from the sequential extraction of *Lessonia vadosa* (Phaeophyta). *J. Chil. Chem. Soc.* 50(2):501-504.
- Chung, J.H., J. Jeun, S.J. Hwang, H.J. Jun, D.K. Kwon & S.J. Lee. 2010. Toxicological Evaluation of Fucoindan from *Undaria pinnatifida* *In Vitro* and *In Vivo*. *Phytother. Res.* 24:1078–1083.
- Cris, E.A. 2007. *A comparison of normal saline and lactated ringer's IV solution in the treatment of shock*. Tesis de Maestría. Universidad de Arizona (E.U.A.), 57p.
- Croci, D.O., A. Cumashi., N.A. Ushakova, M.E. Preobrazhenskaya, A. Piccoli, L. Totani, N.E. Ustyuzhanina, M.I. Bilan, A.I. Usov, A.A. Grachev, G.E. Morozevich,

- A.E. Berman, C.J. Sanderson, M. Kelly, P. Di Gregorio, C. Rossi, N. Tinari, S. Lacobelli, G.A. Rabinovich & N.E. Nifantiev. 2011. Fucans, but Not Fucomannoglucuronans, Determine the Biological Activities of Sulfated Polysaccharides from *Laminaria saccharina* Brown Seaweed. *Plos One* 6(2):e17283.
- Blann D. A., Fitzmaurice A.D. y Lip G. ABC of antithrombotic therapy. Anticoagulation in hospitals and general practice. *Brit. Med, Jour.* Vol. 326:153-156pp.
- Booth, N.H. & L.E. McDonald. 1988. *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Acribia S.A. España. 836p
- Díaz-Concepción, A. & D. Almagro-Vázquez. 2001. Estado actual del mecanismo de la coagulación sanguínea. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 17(2):77-89.
- Dávila-Giráldez .A. & Vidal-Romero R. A. 2007 *Procedimientos experimentales en farmacología y toxicología*. En: Martín-Zúñiga J. & S. Nora-Milocco. (Eds.) Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. McGraw-Hill. España. 448 p.
- De Lara-Issasi G., Alvarez-Hernandez S. y Quintana-Pimentel A. 2004. Screening for anticoagulant substances in some marine macroalgae. *Hidrob.*14 (1):47-54.
- De la Torre- López M.F. 2010. *Estudio de la respuesta inmunológica obtenida al exponer células de ratones Balb/c a extractos del alga parda Macrocystis pyrifera*. México. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE. 129p.
- De Zoysa M., Nikapitiya C., Jeon Y., Jee Y. y Lee J.. 2008. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharide isolated from fermented brown seaweed *Sargassum fulvellum*. *Jour. App. Phycol.* 20:67–74pp.
- Duarte, M.E., M.A. Cardoso, M.D. Nosedá & A.S. Cerezo. 2001. Structural studies on fucoidans from the Brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.* 333(4):281-293.
- Gideon, T.P. & R. Rengasamy. 2008. Toxicological evaluation of fucoidan from *Cladosiphin okamiranus*. *J. Med. Food.* 11(4):638-642.
- Guerra-Rivas G., Gómez-Gutiérrez M., Alarcón-Arteaga G., Soria-Mercado I.E. & Ayala Sánchez N.E. Screening for anticoagulant activity in marine algae from the northwest Mexican Pacific coast. *J. Appl. Phycol.* 23(3): 495-503.

- Guetta, O., K. Mazeau, M. Auzely, M. Milas & M. Rinaudo. 2003. Structure and properties of a bacterial polysaccharide named fucogel. *Biomacromol.* 4:1362-1371.
- Hedrich, H.J & G. Bullock. 2004. *The laboratory mouse*. Elsevier Academic Press (E.U.A.), 600p.
- Holtkamp, D.A. & M. Ruhr. 2009. *Isolation, characterisation, modification and application of fucoidan from Fucus vesiculosus*. Tesis de Doctorado. Alemania. 179p.
- Irhimeha, M.R., J.H. Fittonc & R.M. Lowenthala. 2009. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. *Blood Coagul.Fibrinolysis.* 20(7): 607-610.
- Julian, J., S.K. Das, S.K. Dey, D. Baraniak, V.T. Ta & D.D. Carson. 2001. Expression of heparin/heparan sulfate interactin protein/ribosomal protein L29 during the estrous cycle and early pregnancy in the mouse. *Biol. Reprod.* 64:1165-1175.
- Jappe, U., U. Juschka, N. Kuner, B.M. Hausen & K. Krohn. 2004. Fondaparinux: a suitable alternative in cases of delayed-type allergy to heparins and semisynthetic heparinoids? A study of 7 cases. *Contact Dermatitis.* 51(2):67-72.
- Jouault C.S., Millet J., Helley D., Siquin C. y Fischer A.M. Effect of low-molecular-weight fucoidan on experimental arterial thrombosis in the rabbit and rat. *J. Thromb Haemost.* 1: 1-5pp.
- Kim W.J., Kim S.M., Kim H.G., Oh H.R. & Lee K.B. 2007. Purification and anticoagulant activity of fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* sporophyll. *Algae. Toxicology.* 22(3): 247-252pp.
- Kim K.J., Lee O.H., Lee H.H. & Lee B.Y. 2010. A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats. *Toxicology.* Vol. 267: 154-158pp.
- Kuznetsova T.A, Besednova N.N., Mamaev A.N., Momot A.P., Shevchenko N.M. y Zvyagintseva T.N. Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. *Pharmacology and Toxicology.* 1(5): 471-473pp.
- Kuznetsova T. A. 2009. Fucoidan Extracted from *Fucus Evanescens* Brown Algae Corrects Immunity and Hemostasis Disorders in Experimental Endotoxemia. *Immunology and Microbiology.* 147 (1). 66-69.

- Lancheros R., Caicedo L. & Navarro Y. 2006. Efecto de los nutrientes y condiciones ambientales sobre la producción de polisacáridos por la bacteria *Rhizobium leguminosarum* cepa B. *Departamento de química. Universidad Nacional de Bogotá, Colombia*. 7pp.
- Li, D.W., I.S. Lee, J.S. Sim, T. Toida, R.J. Linhardt & Y.S. Kim. 2004. Long duration of anticoagulant activity and protective effects of acharan sulfate in vivo. *Thromb. Res.* 113:67-73.
- Li, B., F. Lu, X. Wei & R. Zhao. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. 13:1671-1695.
- Lui, J. & L.C. Pedersen. 2007. Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *App.Microbiol. Biotechnol.*74:263-272.
- Matsubara, K. 2004. Recent advances in marine algal anticoagulants. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents*. 2: 13-19.
- Mathers, R.A., G.O. Evans, J. Bleby & T. Tornow. 2008. Evaluation of the sysmex XT-2000iV haematology analyzer for rat, dog and mouse whole blood samples. *Comp. Clin. Phatol.* 17:137-144.
- Masayuki, I. & O. Katsuaki. 1998. Structure and function of heparin and heparan sulfate; heparinoid library and modification of FGF-activities. *Trends Glycoscience Glycotechnol.* 10(52):223-233.
- Mira, A. & M.L. Mathias. 1993. Seasonal effects on the hematology and blood plasma proteins of two species of mice *Mus musculus domesticus* and *M. spretus* (Rodentia: muridae) from protugal. *Italian J. Mammal.* 5:63-72.
- Mayer, A.M.S., L. Krotz, R.D. Bonfil, O.D. Bustuobad, J.F. Groisman, R.M. de Lederkremer & D.B. Stierle.1987. Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. I. Antitumor, cytotoxicity and humoral immune response. *Hydrobiologia.* 151:483-489.
- Medeiros V.P., Queiroz K.C.S., Cardoso M.L., Monteiro G.R.G. Oliveira F.W., Chavante S.F., Guimaraes L.A., Rocha H.A.O. & Leite E.L. 2008. Anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Biochemistry.* 73 (9):1018-1024.
- Medina-Jiménez R. *Estandarización genética, transgenización y clonación. Facultad de ciencias.* Universidad de Granada. España. 24pp.



- Morya V. K., Kim J. y Kim E. K. 2012. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:71–82.
- Muñoz-Ochoa, M. 2006. Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN (México), 64p.
- Muñoz-Ochoa, M., J.I. Murillo-Álvarez, Y.E. Rodríguez-Montesinos, G. Hernández-Carmona, D.L. Arvizu-Higuera, J. Peralta-Cruz & J. Lizardi-Mendoza. 2009. Anticoagulant screening of marine algae from Mexico, and partial characterization of active sulfated polysaccharide from *Eisenia arborea*. *Oceánides*. 24(1): 41-51.
- Mulloy B., Ribeiros A.C., Alves A.P., Vieira R.P. & Mourão A.S. 1994. Repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *J. Biol. Chem.* Vol. 269(35):22113-11123pp.
- Mulloy, B., P.A.S. Mourão & E. Gray. 1999. Structure/function Studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *J. Biotechnol.* 77:123-135.
- Orozco-Colin J., Gattorno-Rodriguez G., Islas-Pedroza & Zapata-Torres M. *Efecto de la adición de NaCl en la mezcla de proteína-polisacárido para la obtención de nanofibras*. 25-26. En: México, (Ed) VI simposio de tecnología avanzada. Memorias en extenso. 30pp.
- Pauper F.G., D. & Alban S.. 2000. Pharmacological activities of sulfated carbohydrate polymers 47-58p. En: Paulsen B.S. (Ed) *Bioactive Carbohydrate Polymers*. Springer. 157p.
- Pereira, M., B. Mulloy & P.A. Mourão. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. *J. Biol. Chem.* 274(12):7656-7667.
- Pereira, S.M., A.C. Vilela-Silva, A.P. Valette & P.A. Mourão. 2002. A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydr. Res.* 337: 2231-2238. .
- Pretsch, E., P. Bühlmann & Badertscher. 2009. Structure determination of organic compounds. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 420p.
- Rocha, H.A.O. E.H.C. Farias, L.C.L.M. Bezerra, I.R.L. Albuquerque, V.P. Medeiros, K.C.S. Queiroz & E.L. Leite. 2004. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. *Infarma*. 6(1-2):82- 86.

- Rocha, H.A. F.A. Moraes, ES. Trindade, C.R. Franco, R.J. Troquato, S.S. Veiga, A.P. Valente, P.A. Mourão, E.L. Leite, H.B. Nader & C.P. Dietrich. 2005. Structural and hemostatic activities of sulfated galactofuran from the Brown alga *Spatoglossum schroederi*. *J. Biol. Chem.* 280(50):41278-41288.
- Ronghua H., Yumin D. y Jianhong Y. 2003. Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivates. *Carbohydrate polymers.* 52: 19-24pp.
- Rosenberg R.D.& Rosenberg S.J. 1984. Natural Anticoagulant Mechanism. *J. Clin. invest.* 74:1-6pp.
- Silva T.M.A., Alves L.G., De Queiroz KCS., Santos M.G.L., Marques C.T., Chavante S.F., Rocha H.A.O y Leite E.L. 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Braz. Med. Biol. Res.* 38 (4): 523- 533 pp.
- Shanmugam M. y Mody H.K. 2000. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potencial blood anticoagulant agents. *Current ciencia.* 79 (12): 1672-1683 pp.
- Shiroma R. Konishi T., Uechi S. y Tako M. 2008. Structural study of fucoidan from the Brown seaweed *Hizikia fusiformis*. *Food Sci. Technol. Res.* Vol. 14(2) 176-182 pp.
- Texeira M.M. y Hellewell P.G. 1997. The effect of the selecting binding polysaccharide fucoidin on eosinophil recruitment *in vivo*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 120:1059-1066pp.
- Treuting P.M., Dintzis S.M., Frevert C.W. & Liggitt D. 2012. *Comparative anatomy and histology a mouse and human atlas*. New York. Academic press is an imprint of Elsevier. 461pp.
- Ushakova N.A., Morozevich G.E., Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Usov A.I., Nifantiev N.E., & Preobrazhenskaya M.E. 2009. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae. *Biochemistry.* 3(1):77-83pp.
- Vidal B.C., Chaubet F., Chevolut L., Siquin C., Theveniaux J., Millet J., Sternberg C., Mulloy B. y Fischer A.M.2000.Relationship Between Antithrombotic Activities of Fucans and Their Structure. *Drug Dev. Res.* 51:216–224pp.

## 11. Anexos.

### Anexo 1. Calendario de inoculación.

MARZO						
L	M	M	J	V	S	D
			1	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	

ABRIL						
L	M	M	J	V	S	D
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30						

MAYO						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			

JUNIO						
L	M	M	J	V	S	D
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	

Toma de muestra sanguínea



Inyección de la fracción 06-019-61 F1 A



Anexo 2. Parámetros y metodologías usadas en el análisis de sangre total, plasma y suero de ratón.

1) Biometría Hemática:

2) Hemoglobina: Espectrofotometría con el método de la Cianometahemoglobina.

Cuenta de Glóbulos rojos: método de reactivo de Hayem. Impedancia eléctrica.

3) Plaquetas. Impedancia eléctrica

4) Leucocitos totales. Reactivo de Turk. Impedancia eléctrica

5) Hematocrito: integración numérica; cuenta diferencial celular manual con tinción Wright.

6) Tiempo de Protrombina:

Tromboplastina tisular proveniente de conejo, iones de Calcio y estabilizador.  
Método foto-óptico

Tiempo de Tromboplastina parcial:

7) Factor plaquetario III. Método foto-óptico

8) SMAC 24

9) Glucosa: Enzimático-Colorimétrico.

10) Urea: Enzimático –UV

11) Creatinina: Colorimétrico.

12) Ac. Úrico: Enzimático-Colorimétrico.

13) Colesterol: Enzimático-Colorimétrico.

14) Triglicéridos: enzimático colorimétrico

15) HDL, VLDL Y LDL: Enzimático -UV

- 16) Bilirrubinas Totales y Directa: Colorimetría.
- 17) TGO: Cinético Ultravioleta.
- 18) TGP: Cinético Ultravioleta.
- 19) Proteínas Totales: Punto final. Reacción de Biuret.
- 20) Albumina: Colorimétrico. Verde de Bromocresol.
- 21) ALP: Enzimático Cinético
- 22) GAMMA GT: Enzimático - Cinético
- 23) Calcio: Arsenazo III. Punto final

Anexo 3. Datos con el promedio  $\pm$  SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de protrombina (TP) en hembras *in vivo*.

Muestreo	5mg/kg F1A	2mg/kg F1A	0.5mg/kg F1A	2mg/kg Hep	S.S.
1	13.55 $\pm$ 0.49	21.2 $\pm$ 1.55	18.05 $\pm$ 0.77	13.75 $\pm$ 0.49	17.3 $\pm$ 0
2	18.75 $\pm$ 0.77	17.45 $\pm$ 1.06	15.7 $\pm$ 0.14	15.9 $\pm$ 0.56	16 $\pm$ 0
3	11 $\pm$ 0	18.05 $\pm$ 0.49	17.55 $\pm$ 0.35	16.05 $\pm$ 0.63	17.9 $\pm$ 1
4	14.25 $\pm$ 0.49	11.9 $\pm$ 0.28	12.9 $\pm$ 0.42	14.7 $\pm$ 0.56	13.95 $\pm$ 1
5	12.1 $\pm$ 0.14	11.5 $\pm$ 0.28	12.6 $\pm$ 0.28	10.5 $\pm$ 0.56	13.65 $\pm$ 0
6	12.7 $\pm$ 0	13.6 $\pm$ 0.28	11.4 $\pm$ 0.98	12.05 $\pm$ 0.35	12.1 $\pm$ 0.28

F1A= Fracción 06-019-61 F1A  
Hep=Heparina  
S.S= Solución salina (0.9% NaCl)

Anexo 4. Datos con el promedio  $\pm$  SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de protrombina (TP) en machos *in vivo*.

<b>Muestreo</b>	<b>5mg/kg F1A</b>	<b>2mg/kg F1A</b>	<b>0.5mg/kg F1A</b>	<b>2mg/kg Hep</b>	<b>S.S.</b>
<b>1</b>	30.8 $\pm$ 0.98	19.15 $\pm$ 0.63	22.6 $\pm$ 0.84	25.15 $\pm$ 0.63	26.35 $\pm$ 0.77
<b>2</b>	14.95 $\pm$ 0.49	17.35 $\pm$ 0.35	22.25 $\pm$ 0.91	14.6 $\pm$ 0.42	16.05 $\pm$ 1.2
<b>3</b>	17.85 $\pm$ 0.35	23.35 $\pm$ 0.35	15.7 $\pm$ 0.84	15.7 $\pm$ 0.56	14.5 $\pm$ 0.56
<b>4</b>	12.85 $\pm$ 0.35	14.75 $\pm$ 0.49	13.5 $\pm$ 0.42	13.8 $\pm$ 0.42	15 $\pm$ 0.28
<b>5</b>	12.15 $\pm$ 0.35	11.95 $\pm$ 0.21	13.45 $\pm$ 0.49	12.4 $\pm$ 0.42	14.05 $\pm$ 0.35
<b>6</b>	12 $\pm$ 0.42	12.3 $\pm$ 0.28	14.9 $\pm$ 0.98	11.05 $\pm$ 0.21	12.4 $\pm$ 0.56

F1A= Fracción 06-019-61 F1A

Hep=Heparina

S.S= Solución salina (0.9% NaCl)

Anexo 5. Datos con el promedio  $\pm$  SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) en hembras *in vivo*.

<b>Muestreo</b>	<b>5mg/kg F1A</b>	<b>2mg/kg F1A</b>	<b>0.5mg/kg F1A</b>	<b>2mg/kg Hep</b>	<b>S.S.</b>
<b>1</b>	40.9 $\pm$ 0.49	30.4 $\pm$ 1.13	48.75 $\pm$ 0.77	58.45 $\pm$ 3.04	39.95 $\pm$ 2
<b>2</b>	45.5 $\pm$ 0.56	57.85 $\pm$ 0.35	38.8 $\pm$ 0.56	49.55 $\pm$ 0.35	45.75 $\pm$ 0
<b>3</b>	30.5 $\pm$ 0.70	35.7 $\pm$ 0.84	44.15 $\pm$ 0.49	61.55 $\pm$ 2.89	57.8 $\pm$ 0
<b>4</b>	31.2 $\pm$ 1.97	38.15 $\pm$ 0.35	38.35 $\pm$ 0.35	30.55 $\pm$ 0.35	31.9 $\pm$ 1
<b>5</b>	31.1 $\pm$ 0.98	32.05 $\pm$ 0.49	38.75 $\pm$ 0.49	34.35 $\pm$ 0.63	28.25 $\pm$ 1
<b>6</b>	37.15 $\pm$ 0.35	41.45 $\pm$ 0.49	33.8 $\pm$ 0.28	39.1 $\pm$ 0.42	45.4 $\pm$ 0

F1A= Fracción 06-019-61 F1A

Hep=Heparina

S.S= Solución salina (0.9% NaCl)

Anexo 6. Datos con el promedio  $\pm$  SD (n=2) obtenidos en el ensayo de tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) en machos *in vivo*.

Muestreo	5mg/kg F1A	2mg/kg F1A	0.5mg/kg F1A	2mg/kg Hep	S.S.
1	180 $\pm$ 0	77.4 $\pm$ 6.78	25.75 $\pm$ 0.21	120 $\pm$ 0	38.85 $\pm$ 0.91
2	51.05 $\pm$ 0.21	38.15 $\pm$ 0.91	47.6 $\pm$ 0.42	53.7 $\pm$ 3.39	53.45 $\pm$ 0.35
3	42.8 $\pm$ 0.56	41.05 $\pm$ 0.35	53.05 $\pm$ 0.21	38.4 $\pm$ 0.42	36.8 $\pm$ 0.28
4	38.65 $\pm$ 0.35	24.05 $\pm$ 0.21	28.25 $\pm$ 0.49	31.1 $\pm$ 0.28	30.15 $\pm$ 1.48
5	28.6 $\pm$ 0.84	32.75 $\pm$ 0.21	38.3 $\pm$ 0.56	36.8 $\pm$ 0.42	29.95 $\pm$ 0.21
6	42.05 $\pm$ 1.20	40.25 $\pm$ 1.34	46.65 $\pm$ 0.21	38.35 $\pm$ 0.35	35.7 $\pm$ 0.42

F1A= Fracción 06-019-61 F1A

Hep=Heparina

S.S= Solución salina (0.9% NaCl)

Anexo 7. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento 5 mg/kg con la fracción 06-019-61 F1A. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	5 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Eritrocitos M/ $\mu$ L	6.23	5.78	6.38	*	6.65	7.04	5.18	5.9	4.9	*	4.88	6.27
Hemoglobina g/dL	11.5	12.4	13.9	*	13.9	15	10.5	11.1	9.5	*	12.2	13.7
Hematocrito %	24	31	37	*	29	31	21	32	25	*	30	28
Vol. glob. Medio (VGM) fl	38.5	53.6	58	*	43.6	44	40.5	54.2	51	*	61.5	44.7
Con. Media Hb (CHCM) d/dL	47.9	40	37.6	*	47.9	48.4	50	34.7	38	*	40.5	48.9
Hem. crop. Media (HCM) pg	18.5	21.5	21.8	*	20.9	21.3	20.3	18.8	19.4	*	24.9	21.8
Leucocitos mm <sup>3</sup>	5.6	8.1	8.6	*	8.4	7.8	6.9	8.7	4.9	*	6.7	6.1
Linfocitos mm <sup>3</sup>	88	86	78	*	92	94	83	82	88	*	89	91
Monocitos mm <sup>3</sup>	1	2	1	*	0	0	2	1	2	*	1	0
Eosinofilos mm <sup>3</sup>	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Basófilos mm <sup>3</sup>	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Inmaduras bandas mm <sup>3</sup>	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Neutrófilos mm <sup>3</sup>	11	12	21	*	8	6	15	17	10	*	10	9



Sexo	Hembras						Machos					
	5 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	Dosis											
Muestreo	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
plaquetas x10 <sup>9</sup> /L	399	216	106	*	104	118	384	264	116	*	214	231
Glucosa sérica mg/dL	110	103	101	121	192	148	122	148	99	98	168	104
Urea sérica mg/dL	57.01	57.3	9.3	43.37	42.05	45.23	57.88	42.5	56.7	48.49	43.12	44.21
Creatinina sérica mg/dL	1.6	1.1	1.1	0.9	0.6	0.7	1.1	1	1.1	1	0.8	0.4
Nitrógeno ureico (BUN) mg/dL	2.14	26.7	27.64	19.99	19.38	20.84	2.75	19.81	26.43	22.35	19.87	20.37
Ácido úrico mg/dL	29.5	26.4	21.8	17.8	12.4	11	20.1	17.5	21.8	10.4	5.5	7.6
Colesterol total mg/dL	148	182	118	201	112	178	179	176	138	165	128	126
Triglicéridos mg/dL	278	180	270	224	121	145	241	214	251	176	135	128
Colesterol HDL mg/dL	42	39	53	45	45	41	38	36	49	49	43	62.4
Colesterol LDL mg/dL	50.4	107	11	111.2	42.8	108	92.8	97.2	38.8	80.8	58	62.4
Colesterol no HDL mg/dL	97.6	75	107	89.8	69.2	70	86.2	78.8	99.2	84.2	70	63.6
Colesterol VLDL mg/dL	55.6	36	54	44.8	24.2	29	48.2	42.8	50.2	35.2	27	25.6
Cociente aterogénico	3.52	4.67	2.23	4.47	2.49	4.23	4.71	4.89	2.82	3.37	2.98	25.6
Bilirrubina total mg/dL	0.6	0.8	0.6	1	0.31	0.22	0.7	0.3	0.6	0.8	0.27	0.29

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	5 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
B. directa mg/Dl	0.41	0.4	0.4	0.4	0.02	0.18	0.5	0.1	0.2	0.3	0.18	0.15
B. indirecta mg/dL	0.19	0.4	0.2	0.6	0.29	0.04	0.2	0.2	0.4	0.5	0.09	0.14
Fosfatasa alcalina (ALP) U/L	340	325	310	181	9	20	256	410	358	164	28	31
Trans. Glutámico oxalacetica (AST) U/L	260	280	538	248	465	307	407	248	339	191	94	279
Trans. Glut. Pirúvica (ALT) U/L	39	60	60	78	520	65	87	60	94	95	465	63
Gama glutamyltranspeptidasa (gGT) U/L	13	12	0	7	4	4	14	14	10	0	0	3
Proteínas totales gr/dL	7.8	7.6	6.8	7.5	6.3	6.2	8.1	7.2	6.3	6.6	5.2	6.8
Albúmina gr/dL	5.2	4.1	4.6	3.1	3.1	3.4	5.1	3.6	4.2	3.5	2.9	2.9
Globulina gr/dL	2.6	3.5	2.2	4.4	3.2	2.8	3	3.6	2.1	3.1	2.3	3.9
Relación A/C	2	1.2	2.1	0.7	1	1.2	1.7	1	2	1.1	1.3	0.7

\*Datos no obtenidos

Anexo 8. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento 2 mg/kg con la fracción 06-019-61 F1A. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.

Sexo	Hembras						Machos					
	2 mg/kg de 06-019-61 F1A											
Dosis												
Muestreo	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Eritrocitos M/ $\mu$ L	5.4	6.84	5.28	4.79	5.49	6.22	7.23	5.12	7.12	3.96	4.75	6.04
Hemoglobina g/dL	14.7	13.5	13.4	13.8	15.8	15	18.6	11.7	15.7	11.1	14	14.5
Hematocrito %	31	33	31	33	38	31	40	32	39	27	32	31
Vol. glob. Medio (VGM) FI	57.4	48.2	58.7	68.9	69.2	49.8	55.3	62.5	54.8	68.2	67.4	51.3
Con. Media Hb (CHCM) d/dL	47.4	40.9	43.2	41.8	41.6	48.3	46.5	36.6	40.3	41.1	43.8	46.7
Hem. crop. Media (HCM) Pg	27.2	19.7	25.4	28.8	28.8	24.1	25.7	22.9	22.1	28	29.5	24
Leucocitos mm <sup>3</sup>	31	5.6	6.3	8.9	7.1	5.6	7.7	9.1	8.5	7.9	7.1	4.9
Linfocitos mm <sup>3</sup>	88	91	91	90	88	92	90	87	89	88	91	92
Monocitos mm <sup>3</sup>	1	0	0	2	2	0	2	1	2	1	2	1
Basófilos mm <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inmaduras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bandas mm <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos mm <sup>3</sup>	11	9	9	8	10	6	8	12	9	11	7	7
plaquetas x10 <sup>9</sup> /L	198	301	86	181	167	319	264	194	157	79	187	154

Sexo Dosis	Hembras						Machos					
	2 mg/kg de 06-019-61 F1A											
Muestreo	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Glucosa sérica mg/dL	90	92	86	64	232	133	87	81	88	135	164	115
Urea sérica mg/dL	56.31	51.4	64.8	45.41	40.01	42.74	63.3	44.8	61.9	48.17	44.63	38.51
Creatinina sérica mg/dL	1	1.5	1.4	0.7	0.7	0.6	1.2	1.8	1.2	0.8	0.4	0.5
Nitrógeno ureico (BUN) mg/dL	2.64	23.96	30.2	20.93	18.44	19.7	2.98	20.88	28.85	22.2	20.57	17.75
Ácido úrico mg/dL	16.9	20.8	29.5	3.4	17.9	6.6	23.1	21.3	21.3	7.4	8	7
Colesterol total mg/dL	191	176	149	178	150	112	183	193	166	182	129	130
Triglicéridos mg/dL	251	214	224	182	148	120	274	198	176	149	150	134
Colesterol HDL mg/dL	56	44	48	42	38	39	46	36	34	42	39	45
Colesterol LDL mg/dL	84.8	89.2	56.2	99.6	82.4	49	82.2	117.4	96.8	110.2	60	58.2
Colesterol no HDL mg/dL	106.2	86.8	92.8	78.4	67.6	63	100.8	75.6	69.2	71	69	71.8
Colesterol VLDL mg/dL	50.2	42.8	44.8	36.4	29.6	24	54.8	39.6	35.2	29.8	30	26.8
Cociente aterogénico	3.41	4	3.1	4.24	3.95	2.87	3.98	5.36	4.88	4.33	3.31	2.89
Bilirrubina total mg/dL	0.4	0.6	0.5	0.4	0.1	0.4	0.5	0.4	0.7	0.7	0.02	0.3
B. directa mg/dL	0.1	0.2	0.3	0.1	0.01	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.01	0.16
B. indirecta mg/dL	0.3	0.4	0.2	0.3	0.09	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.01	0.14
Fosfatasa alcalina (ALP) U/L	409	290	390	241	12	22	476	361	279	308	45	25

Sexo Dosis	Hembras						Machos					
	2 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	Muestreo	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
Trans. Glutámico oxalacética (AST) U/L	407	291	581	329	358	281	546	321	295	235	291	240
Trans. Glut. Pirúvica (ALT) U/L	87	69	85	86	302	70	61	75	109	102	207	48
Gama glutamiltranspeptidasa (gGT) U/L	11	9	13	13	7	5	10	18	14	5	8	3
Proteínas totales gr/dL	7.6	6.5	6.4	7	5.8	6.5	7.5	6.4	6.7	7.1	7	7.1
Albumina gr/dL	5.5	4.1	4.1	4	2.8	3.1	5.7	4.3	4.6	3.8	3.4	3
Globulina gr/dL	2.1	2.4	2.3	3	3	3.4	1.8	2.1	2.1	3.3	3.6	4.1
Relación A/C	2.6	1.7	1.8	1.3	0.9	0.9	3.2	2	2.2	1.2	0.9	0.7

\*Datos no obtenidos

Anexo 9. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento con 0.5 mg/kg de la fracción 06-019-61 F1A. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Eritrocitos M/ $\mu$ L	5.3	5.3	6.4	*	5	5.4	5.1	4.9	4.4	*	3.2	5.7
hemoglobina g/dL	13.6	13.7	15.1	*	14.5	13.4	12.6	12.8	10.6	*	9	13.2
Hematocrito %	30	33	38	*	38	33	28	33	26	*	24	32
Vol.glob. Medio (VGM) FI	56.3	62.3	59.7	*	75.8	61.6	54.7	67.5	59.4	*	74.1	56.0
Con. Media Hb (CHCM) d/dL	45.3	41.5	39.7	*	38.2	40.6	45.0	38.8	40.8	*	37.5	41.4
Hemo crop. Media (HCM) pg	25.5	25.8	23.7	*	28.9	25.0	24.6	26.2	24.2	*	27.8	23.2
Leucocitos mm <sup>3</sup>	8.3	8.4	6.4	*	7.9	9.7	6.1	5.1	4.2	*	6.1	6.8
Linfocitos mm <sup>3</sup>	91	85	84	*	91	97	84	94	90	*	94	89
Monocitos mm <sup>3</sup>	1	2	2	*	1	0	0	0	1	*	0	2
Eosinofilos mm <sup>3</sup>	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Basófilos mm <sup>3</sup>	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Inmaduras	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Bandas mm <sup>3</sup>	0	0	0	*	0	0	0	0	0	*	0	0
Neutrófilos mm <sup>3</sup>	8	13	13	*	8	3	16	6	9	*	6	9
Plaquetas 10 <sup>9</sup> /L	275	187	246	*	94	299	413	108	81	*	193	349
Glucosa sérica mg/dL	80	94	104	*	170	112	159	89	91	*	196	160

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Urea sérica mg/dL	54.8	45.1	56.5	*	48.3	46.9	50.6	38.7	53.8	*	43.2	49.4
Creatinina sérica mg/dL	1.1	1.2	1.3	*	0.5	0.7	1	0.9	1	*	0.6	1
Nitrógeno ureico(BUN) mg/dL	2.6	21	26.3	*	22.3	21.6	2.4	18	25.1	*	19.9	22.8
Ácido úrico mg/dL	24	19.8	24	*	9.6	9.6	20.1	23.8	29.3	*	10.1	9.2
Colesterol total mg/dL	178	185	199	*	115	134	202	176	203	*	136	145
Triglicéridos mg/dL	253	201	258	*	127	113	220	260	178	*	158	162
Colesterol HDL mg/dL	51	46	43	*	40	42	48	33	40	*	45	40
Colesterol LDL mg/dL	76.4	98.8	104.4	*	49.6	69.4	110	91	127.4	*	59.4	72.6
Colesterol no HDL mg/dL	101.6	86.2	94.6	*	65.4	64.6	92	85	75.6	*	76.6	72.4
Colesterol VLDL mg/dL	50.6	40.2	51.6	*	25.4	22.6	44	52	35.6	*	31.6	32.4
Cociente aterogénico	3.5	4.2	4.6	*	2.9	3.2	4.2	5.3	5.1	*	3.0	3.6
Bilirrubina total mg/dL	3	0.8	1	*	0.1	0.2	0.4	0.7	0.8	*	1.2	0.3
B. directa mg/dL	0.1	0.5	0.1	*	0.1	0.3	0.2	0.3	0.5	*	0.9	0.2
B. indirecta mg/dL	0.2	0.3	0.9	*	0.0	0.1	0.2	0.4	0.3	*	0.3	0.1
Fosfatasa alcalina (ALP) U/L	280	348	470	*	51	35	306	358	303	*	45	40
Trans. Glutámico oxalacética (AST) U/L	380	348	331	*	626	330	664	298	255	*	541	249

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	0.5 mg/kg de 06-019-61 F1A											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Trans. Glut. Pirúvica (ALT) U/L	50	92	103	*	464	85	95	88	95	*	390	112
Gama glutamil transpeptidasa(gGT) U/L	0.0	12	16	*	7	7	11	11	10	*	10	2
Proteínas totales gr/dL	7.7	5.6	6.9	*	6.8	7	8.5	6.7	6.5	*	6.5	7.4
Albúmina gr/dL	5.2	4.2	4.7	*	3.7	2.8	5.3	4.4	4	*	3.3	2.8
Globulina gr/dL	2.5	1.4	2.2	*	3.1	4.2	3.2	2.3	2.5	*	3.2	4.6
Relación A/C	2.1	3	2.1	*	1.2	0.7	1.7	1.9	1.6	*	1.0	0.6

\*Datos no obtenidos



Anexo 10. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del tratamiento con 2 mg/kg de heparina sódica. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.

Sexo	Dosis	Hembras						Machos					
		2 mg/kg Heparina sódica											
Muestreo		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Eritrocitos	M/ $\mu$ L	4.81	6.4	5.68	4.86	5.41	5.96	4.67	5.33	5.27	4.16	4.97	5.62
Hemoglobina	g/dL	13.2	13.9	13.9	13.9	15.8	14.9	12.6	13.6	13.7	11.9	14.5	13.5
Hematocrito	%	29	37	35	34	40	37	27	30	32	28	37	32
Vol.glob. Medio (VGM)	fl	60.3	57.8	61.6	70	73.9	62.1	58.6	56.3	60.7	67.3	74.4	56.9
Con. Media Hb (CHCM)	d/DI	45.5	37.6	39.4	40	39.5	40.3	46.7	45.3	42.8	42.5	39.2	42.2
Hem. crop. Media (HCM)	Pg	27.4	21.7	24.3	28.6	29.2	25	27.3	25.5	26	28.6	29.2	24
Leucocitos	$\text{mm}^3$	4.2	9.7	7.5	6.8	5.3	7.4	6.3	8.3	5.1	6.5	10.5	6.7
Linfocitos	$\text{mm}^3$	90	89	93	93	89	94	78	91	88	92	91	90
Monocitos	$\text{mm}^3$	1	1	0	0	3	1	2	1	1	1	2	1
Eosinofilos	$\text{mm}^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Basófilos	$\text{mm}^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inmaduras		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bandas	$\text{mm}^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos	$\text{mm}^3$	9	10	7	7	8	5	20	8	11	7	7	9
Plaquetas	$10^9/L$	285	284	156	291	173	99	312	275	167	112	148	117
Glucosa sérica	mg/dL	120	86	97	*	131	120	79	80	89	112	158	98

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	2 mg/kg Heparina sódica											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Urea sérica mg/dL	61.41	63.2	47.6	*	40.9	39.53	57.12	50.2	52.4	41.3	45.1 3	45.49
Creatinina sérica mg/dL	1.2	1.2	0.9	*	0.3	0.5	1.1	1.4	0.7	1.1	0.6	0.4
Nitrógeno ureico(BUN) mg/dL	2.88	23.4 6	22.18	*	18.8 5	18.22	2.68	23.4	22.42	19.32	20.8	20.96
Ácido úrico mg/dL	24.9	20.4	20	*	14.3	11.3	29.3	27.3	18.4	12.4	6.7	8.3
Colesterol total mg/dL	135	204	185	*	129	129	159	137	194	191	102	114
Triglicéridos mg/dL	174	231	204	*	130	130	256	178	210	152	191	132
Colesterol HDL mg/dL	34	35	46	*	48	38	57	36	53	48	48	40
Colesterol LDL mg/dL	66.2	122. 8	98.2	*	55	65	50.8	65.4	99	112.6	15.8	47.6
Colesterol no HDL mg/dL	68.8	81.2	86.8	*	74	64	108.2	71.6	95	78.4	86.2	66.4
Colesterol VLDL mg/dL	34.8	46.2	40.8	*	26	26	51.2	35.6	42	30.4	38.2	26.4
Cociente aterogénico	3.97	5.83	4.02	*	2.69	3.39	2.79	3.81	3.66	3.98	2.13	2.85
Bilirrubina total mg/dL	0.71	0.9	0.6	*	0.17	0.3	0.48	1	0.4	1.2	0.34	0.2
B. directa mg/dL	0.6	0.6	0.4	*	0.1	0.08	0.2	0.5	0.2	0.8	0.21	0.1
B. indirecta mg/dL	0.11	0.3	0.2	*	0.07	0.22	0.28	0.5	0.2	0.4	0.13	0.1
Fosfatasa alcalina (ALP) U/L	351	249	291	*	18	48	379	421	322	209	22	51
Trans. Glutámico oxalacetica (AST) U/L	461	301	389	*	450	275	249	266	251	185	337	291

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	2 mg/kg Heparina sódica											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Trans. Glut. Pirúvica (ALT) U/L	103	46	98	*	384	83	101	94	103	81	181	78
Gama glutamiltranspeptidas a (gGT) U/L	0	17	13	*	9	5	15	15	9	0	6	4
Proteínas totales gr/dL	7.5	7.2	6.7	*	7	6.9	7.7	6.8	6.8	6.5	5.9	8.69
Albúmina gr/dL	5.6	5	4.6	*	3.8	3.5	5.3	4.4	4.3	3.3	2.5	3.4
Globulina gr/dL	1.9	2.2	2.1	*	3.2	3.4	2.4	2.4	2.5	3.2	3.4	3.4
Relación A/C	2.9	2.3	2.2	*	1.2	1	2.2	1.8	1.7	1	0.7	1

\*Datos no obtenidos

Anexo 11. Datos de biometría hemática y química sanguínea (SMAC 24) obtenidos del grupo al que se inyectó solución salina (0.9% NaCl). Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 1) el 11/04/2012, 2) el 25/04/2012, 3) 09/05/2012, 4) 23/05/2012, 5) 06/06/2012 y 6) 27/06/2012.

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	Solución salina (0.9% NaCl)						Solución salina (0.9% NaCl)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Eritrocitos M/ $\mu$ L	5.3	7.1	4.9	*	4.8	8.6	4.7	5.3	3.7	3.3	4.8	6.0
Hemoglobina g/dL	14.0	17.5	12.5	*	13.7	20.8	12.7	12.4	8.4	3.7	13.3	14.9
Hematocrito %	31.0	36.0	29.0	*	28.0	44.0	27.0	33.0	20.0	20.0	36.0	37.0
Vol.glob. Medio (VGM) fl	58.2	50.7	59.7	*	58.3	50.9	57.0	62.3	54.5	60.8	75.6	62.1
Con. Media Hb (CHCM) d/dL	45.2	48.6	43.1	*	48.9	47.3	47.0	37.6	42.0	43.5	36.9	40.3
Hemo crop. Media (HCM) pg	26.3	24.6	25.7	*	28.5	24.1	26.8	23.4	22.9	26.4	27.9	25.0
Leucocitos $\text{mm}^3$	8.3	7.5	6.4	*	6.8	10.1	6.1	10.4	4.1	4.9	7.9	7.4
Linfocitos $\text{mm}^3$	76.0	92.0	96.0	*	90.0	97.0	89.0	93.0	84.0	86.0	87.0	94.0
Monocitos $\text{mm}^3$	1	1	1	*	1	0	0	0	4	2	2	1
Eosinofilos $\text{mm}^3$	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
Basófilos $\text{mm}^3$	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
Inmaduras	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
Bandas $\text{mm}^3$	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos $\text{mm}^3$	23	7	3	*	9	3	11	7	12	12	11	5
Plaquetas $10^9/\text{L}$	173	307	204	*	281	277	301	182	97	91	265	99

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	Solución salina (0.9% NaCl)											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Glucosa sérica mg/dL	102	92	76	*	177	102	109	78	85	17	160	111
Urea sérica mg/dL	58.1	58.2	57.9	*	48.1	49.0	51.9	61.8	58.6	47.2	45.8	47.2
Creatinina sérica mg/dL	1	1	1.2	*	0.7	0.8	1	1.2	1	0.6	0.9	0.6
Nitrógeno ureico(BUN) mg/dL	2.7	27.1	27	*	22.8	22.6	2.4	28.8	27.3	21.7	21.1	21.8
Ácido úrico mg/dL	20.3	24.5	16.8	*	15.4	7.4	18.2	18.2	20.5	21.5	12.8	8.1
Colesterol total mg/dL	156	157	172	*	106	134	116	154	194	6	148	153
Triglicéridos mg/dL	162	219	198	*	172	139	192	222	203	4	224	124
Colesterol HDL mg/dL	37	54	48	*	39	32	32	56	38	148	47	37
Colesterol LDL mg/dL	86.6	59.2	84.4	*	32.6	74.2	45.6	53.6	115.4	195	56.2	91.2
Colesterol no HDL mg/dL	69.4	97.8	87.6	*	73.4	59.8	70.4	100.4	78.6	41	91.8	61.8
Colesterol VLDL mg/dL	32.4	43.8	39.6	*	34.4	27.8	38.4	44.4	40.6	68	44.8	24.8
Cociente aterogénico	4.2	2.9	3.6	*	2.7	4.2	3.6	2.8	5.1	80	3.2	4.1
Bilirrubina total mg/dL	0.5	0.3	0.7	*	1.1	0.2	0.3	0.9	0.5	0.9	0.9	0.1
B. directa mg/dL	0.1	0.1	0.1	*	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5	0.1	0
B. indirecta mg/dL	0.4	0.2	0.6	*	1.0	0.1	0.2	0.7	0.4	0.4	0.8	0.1
Fosfatasa alcalina (ALP) U/L	272	491	358	*	43	56	159	332	390	126	164	36
Trans. Glutámico oxalacética (AST) U/L	536	345	461	*	434	241	383	413	407	213	428	260

Sexo Dosis Muestreo	Hembras						Machos					
	Solución salina (0.9% NaCl)											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Trans. Glut. Pirúvica (ALT) U/L	150	83	141	*	501	90	98	71	89	75	97	95
Gama glutamiltranspeptidasa (gGT) U/L	12	13	0	*	4	3	11	11	14	0	0	6
Proteínas totales gr/dL	7.8	6.3	6.5	*	6.0	7	7.5	6.5	6.3	6.2	6.5	6.2
Albúmina gr/dL	5.0	4.4	4.4	*	3.9	3.3	4.7	4.2	4	3.6	3.2	3
Globulina gr/dL	2.8	1.9	2.1	*	2.1	3.7	2.8	2.3	2.3	2.6	3.3	3.2
Relación A/C	1.8	2.3	2.1	*	1.9	0.9	1.7	1.8	1.7	1.4	1	0.9

\*Datos no obtenidos