

**Guareide Carelli**

**ASSOCIAÇÃO DE DOSES BAIXAS DE HEPARINA NÃO  
FRACIONADA E DE HEPARINA DE BAIXO PESO  
MOLECULAR NA PREVENÇÃO DE TROMBOSE  
VENOSA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia  
Área de Concentração em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental  
da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei**  
**Coorientador: Profa. Dra. Luci Mattar**

Botucatu – SP  
2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Carelli, Guareide.

Associação de doses baixas de heparina não fracionada e de heparina de baixo peso molecular na prevenção de trombose venosa experimental / Guareide Carelli. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientador: Francisco Humberto de Abreu Maffei

Assunto CAPES: 40102149

1. Trombose - Tratamento - Estudos experimentais

CDD 616.135

Palavras-chave: Heparina; Heparina de baixo peso molecular; Trombose experimental; Trombose venosa

## **AGRADECIMENTOS**

Sinceramente, agradeço aos meus orientadores Professor Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei e Professora Dra. Luci Mattar, pelo empenho e dedicação a mim oferecidos, pelo exemplo de profissionalismo e cuidado extremo com a formação acadêmica e pessoal. Também, agradeço pelas leves tardes, preenchidas por discussões teóricas, políticas e por assuntos cotidianos nas quais, juntos, convivemos nos últimos meses.

Agradeço a Maria Helena Spadot de Lima, amiga e braços direito e esquerdo, pelo imprescindível auxílio na prática experimental deste trabalho.

Agradeço, ainda, a bióloga Iracema Carvalho Ferrari pela realização dos testes laboratoriais executados neste trabalho e à Dra. Izoete Aparecida Thomazini-Santos, a qual possibilitou a utilização do Laboratório de Hemostasia do Hospital das Clínicas da UNESP, assegurando credibilidade nos resultados obtidos.

Agradeço aos demais funcionários do Laboratório de Hemostasia, Delane, Denise e Walter, os quais contribuíram, de maneira fundamental, para a execução deste trabalho.

Agradeço à Professora Dra. Lídia Raquel de Carvalho pela ajuda na Análise Estatística e a Professora Hilda, pela primorosa e elegante ajuda com os entraves da Língua Portuguesa.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu marido Reginaldo Carlos Boni, exemplo de perseverança e dedicação, pela incansável ajuda e inesgotável fonte de incentivo.

Dedico também a minha família, que me deu e, ainda me dá, régua e compasso.

## **NOTA EXPLICATIVA**

A presente dissertação segue a atual orientação do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia, que permite a redação do trabalho na forma de capítulos elaborados como trabalhos prontos para encaminhamento para publicação em periódicos científicos, de acordo com as normas das revistas escolhidas.

Assim, o primeiro capítulo, que é uma revisão da literatura, foi redigido de acordo com as normas da Revista Iberoamericana de Thrombosis y Hemostasia. O segundo capítulo, que é um trabalho original de pesquisa, foi redigido em português, porém segue as normas da revista Thrombosis Research.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	01
<b>AÇÃO ANTITROMBÓTICA DAS HEPARINAS : UMA REVISÃO</b> .....	02
Abreviaturas .....	03
Resumo .....	04
Palavras chaves .....	04
Abstract .....	05
Key words .....	05
<b>Heparina não fracionada</b> .....	06
Histórico .....	07
Estrutura e mecanismo de ação .....	08
Farmacocinética da HNF .....	16
Monitorização laboratorial .....	18
Limitações da heparinoterapia .....	20
Uso clínico da heparina .....	20
<b>Heparinas de baixo peso molecular</b> .....	21
Peso molecular e atividade .....	23
Mecanismo de ação .....	25
Farmacocinética .....	27
Monitorização laboratorial .....	29
Aplicações clínicas .....	30
<b>Complicações do tratamento heparínico</b> .....	31
• Hemorragia .....	31
• Trombocitopenia induzida pela heparina (TIH) .....	34
• Osteoporose .....	36
Bibliografia .....	38
<b>CAPÍTULO II</b> .....	54
<b>ASSOCIAÇÃO DE DOSES BAIXAS DE HEPARINA NÃO FRACIONADA E DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR NA PREVENÇÃO DE TROMBOSE VENOSA EXPERIMENTAL</b> .....	55
Abreviaturas .....	56
Resumo .....	57
Palavras chaves .....	58
Abstract .....	59
Key Words .....	60
Introdução .....	61
Material e Método .....	63
• Animais .....	63
• Drogas .....	64
• Reagentes .....	64
• Grupos Experimentais .....	64

• Indução da trombose venosa .....	65
• Tempo de sangramento (TS) .....	66
• Determinação do tempo de trombina (TT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) .....	66
• TS, TT e TTPA no momento correspondente à indução da trombose .....	67
• Análise Estatística .....	67
Resultados.....	68
• Peso dos animais .....	68
• Presença de trombo .....	68
• Peso do trombo.....	68
• Tempo de sangramento (TS) .....	72
• Tempo de trombina (TT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) .....	74
Discussão .....	78
Bibliografia .....	86
Anexo .....	96

## *Capítulo I*

---



**AÇÃO ANTITROMBÓTICA DAS HEPARINAS:  
UMA REVISÃO**

**ABREVIATURAS**

- ADP – adenosina difosfato
- AT – Antitrombina
- ATP – adenosina trifosfato
- CIVD – coagulação intravascular disseminada
- FvW – fator de von Willebrand
- F4 – fator plaquetário 4
- GP – glicoproteína
- HBPM – heparina de baixo peso molecular
- HNF – heparina não fracionada
- kDa – quilodálton
- M – molar
- ml – mililitro
- mm – milímetro
- pm – peso molecular
- SC – subcutâneo
- TFPI – inibidor da via do fator tecidual
- TIH – trombocitopenia induzida pela heparina
- t-PA – ativador tecidual do plasminogênio
- TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada
- TVP – trombose venosa profunda
- UI – unidade internacional
- u-PA – ativador do plasminogênio, tipo urinário

**RESUMO**

A heparina é um glicosaminoglicano sulfatado, de cadeia longa, que vem sendo largamente utilizada, desde meados do século passado, no tratamento e profilaxia das trombozes arteriais e venosas e cuja utilização permitiu o desenvolvimento das cirurgias cardíaca e vascular.

As heparinas de baixo peso molecular (HBPM) são frações ou fragmentos da heparina separados do complexo polissacarídico por extração com solvente ou por gel filtração, ou por clivagem química ou enzimática aplicada antes dessa separação física.

No presente artigo são revistos os diversos aspectos da estrutura, mecanismo de ação, farmacocinética, monitorização laboratorial e aplicações clínicas de ambos os tipos de substâncias, sendo chamada a atenção para as diferenças entre elas.

As HBPM tendem a substituir a heparina não fracionada, na maior parte de suas indicações, por serem de mais simples utilização e apresentarem maior eficácia e segurança em algumas indicações, embora sejam de custo mais alto.

**PALAVRAS CHAVES**

- heparina, heparina de baixo peso molecular, anticoagulantes, trombozes.

---

**ABSTRACT**

Heparin is a long sulfated glucosaminoglicane chain has been used in the treatment and prophylaxis of arterial and venous thrombosis since the 50's of last century. Its use also aided the development of cardiac and vascular surgery.

Low molecular weight heparins (LMWH) are fractions or fragments of heparin separated from the polysaccharide complex by solvent extraction or gel filtration, or by chemical or enzymatic cleavage, before the extraction.

In this article the main aspects of structure, mechanism of action, pharmacokinetics, laboratorial control, and clinical indications of both kinds of substances are reviewed and their main differences emphasized.

Despite their high cost, LMWH presently tend to substitute unfractionated heparin in the majority of indications because of its simpler use, high efficacy and security in some cases.

**KEY WORDS**

- Heparins, low molecular weight heparin, anticoagulants, thrombosis.

### **INTRODUÇÃO**

Heparina é um glicosaminoglicano sulfatado de cadeia longa, atualmente extraída, principalmente, de intestino porcino. A denominação heparina se deve ao fato de ter sido inicialmente obtida do fígado [1].

A heparina é largamente utilizada no tratamento e na profilaxia de trombozes arteriais e venosas e sua utilização permitiu o desenvolvimento das cirurgias cardíaca e vascular. Sua ação deve-se, principalmente, à inibição da formação e da ação da trombina.

Quando um rápido efeito anticoagulante é requerido, a heparina é a droga de escolha, devido à sua ação imediata após administração intravenosa.

A heparina tem sido estudada, clínica e experimentalmente, também por aumentar a função endotelial, promover angiogênese, suprimir resposta inflamatória, modular proteases, inibir proteínas do complemento e a ativação de mastócitos, suprimir atividade da musculatura vascular e proliferação celular [2]. Essas ações não serão focalizadas na presente revisão, que discutirá apenas sua ação antitrombótica.

### HISTÓRICO

A heparina foi descoberta por McLean em 1916 [3], na época um estudante de medicina trabalhando no laboratório de William Howell, no Hospital John Hopkins. Embora Howell fosse cético quanto a essa descoberta, oposta em relação ao seu propósito de estudo, já que procurava uma substância coagulante potente, McLean foi perseverante e descobriu um eficiente anticoagulante, que deu origem a uma substância, depois utilizada universalmente em uma variedade de distúrbios trombóticos arteriais e venosos, até os dias atuais [2]. A base estrutural da heparina foi, subsequente, definida por Jorpes [4], em 1935, como um glicosaminoglicano altamente sulfatado.

Brinkhous *et al* [5], em 1939, demonstraram que a inibição da formação de trombina pela heparina não ocorria em fibrinogênio e trombina isolados e que, provavelmente, necessitava de um fator plasmático, até então desconhecido. Abildgaard [6] separou e identificou esta substância como uma glicoproteína, descrevendo-a como sendo o principal inibidor da trombina no plasma e nomeado-a de antitrombina III (AT-III), que atualmente, é chamada apenas de Antitrombina (AT) [7]. Lindahl *et al* [8], em 1979, separaram as frações da heparina de alta e de baixa afinidade à AT, que possuem, respectivamente, alta e baixa atividade anticoagulante. Esses autores sugeriram que um ácido idurônico não sulfatado, na posição 3, seria fundamental, mas não exclusivo, para ligação entre AT e heparina, por estar presente em todos os fragmentos de ligação.

### ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO

Heparina é uma substância heterogênea em relação ao seu peso molecular, estrutura, atividade anticoagulante e afinidade cromatográfica. Ela é um glicosaminoglicano composto por moléculas de diferentes pesos [9], variando entre 2 e 40 kDa (média de 15 a 18 kDa) [9, 10].

Rosenberg e Lam [11] defenderam a presença invariável de uma seqüência tetrassacarídica, na molécula de heparina, fundamental para a ligação com a AT. Subseqüentemente, foi descoberto que a heparina se liga à AT e potencializa a atividade desta através de uma única unidade glicosamina contida no interior de uma seqüência pentassacarídica [8, 11, 12, 13] (figura 1).

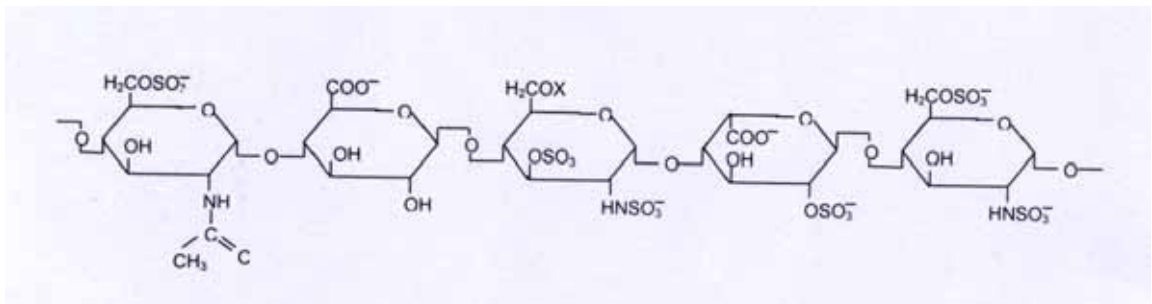


Figura 1. Estrutura da seqüência pentassacarídica que contém a região de ligação da AT com a heparina, segundo Holmer *et al* [14].

A ligação heparina-AT induz uma mudança conformacional nesta enzima, resultando em uma inativação acelerada das serino-proteases [15]. Esse complexo inibe vários fatores ativados da coagulação, entre eles, os fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e IIa (trombina) [9] (figura 2).

A AT neutraliza a trombina pela formação de um complexo estequiométrico 1:1 entre a arginina (sítio reativo da AT) e a serina (centro

## *Estrutura e mecanismo de ação*

ativo da trombina), através de uma reação covalente [14, 16]. A formação do complexo ocorre em uma velocidade relativamente lenta na ausência de heparina. Entretanto, quando presente, o polissacarídeo se liga a resíduos lisil da AT e acelera extraordinariamente a geração do complexo de interação [16]. A seqüência pentassacarídica específica é o elemento estrutural crucial para a ligação de alta afinidade da heparina à AT e, portanto, para o desenvolvimento de sua atividade anticoagulante [8, 11, 17]. Aproximadamente, apenas um terço das moléculas de heparina se liga à AT [16], e são essas moléculas que contêm a seqüência pentassacarídica responsável por, pelo menos, 80% da atividade anticoagulante da heparina [9, 18]. Os dois terços restantes têm mínima atividade anticoagulante em concentrações terapêuticas. Em concentrações maiores que as usuais, ambas as moléculas, de alta e de baixa afinidade, catalisam o efeito da AT, agindo também sobre uma segunda proteína plasmática, o cofator II da heparina [7].

A heparina liga-se também à trombina em um sítio distinto de seu centro ativo [19, 20]. A interação da trombina com a heparina é forte, com uma constante de  $10^{-7}$  M [20], portanto, mais forte do que a ligação com a AT. Machovich [21], em 1978, sugeriu que a heparina, se ligando à trombina, promovia uma mudança conformacional nesta, que a tornava mais susceptível à ação do seu inibidor e que ambas, AT e trombina, eram conectados por uma ponte de heparina. Sugeriu, também, que as moléculas de heparina maiores do que 6 kDa seriam as capazes de acomodar ambas, trombina e AT. A velocidade de inibição da trombina pela AT



aumenta de 3 a 4 vezes, na presença de heparina [22].

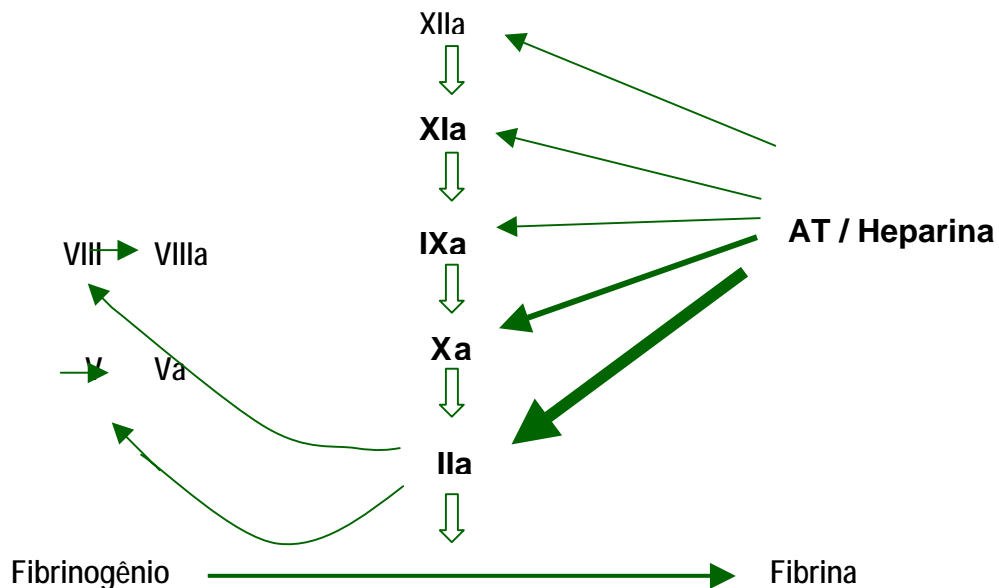


Figura 2. Inativação dos fatores de coagulação pelo complexo heparina-antitrombina. A trombina e o fator Xa são as proteínas mais responsivas, sendo a trombina 10 vezes mais sensível à inibição que o fator Xa. Segundo Hirsh *et al* [7].

A heparina dissocia-se do complexo ternário e pode continuar agindo de forma catalítica. Desta maneira uma molécula de heparina pode se ligar a várias moléculas de AT e de trombina (figura 3).

A trombina e o fator Xa são os fatores mais susceptíveis à inibição pela heparina, sendo que a trombina humana é aproximadamente 10 vezes mais sensível à inibição pelo complexo heparina/AT do que o fator Xa. Diferente do que acontece na inibição da trombina, não ocorre a ligação da heparina com o fator Xa para que este seja inibido [13].

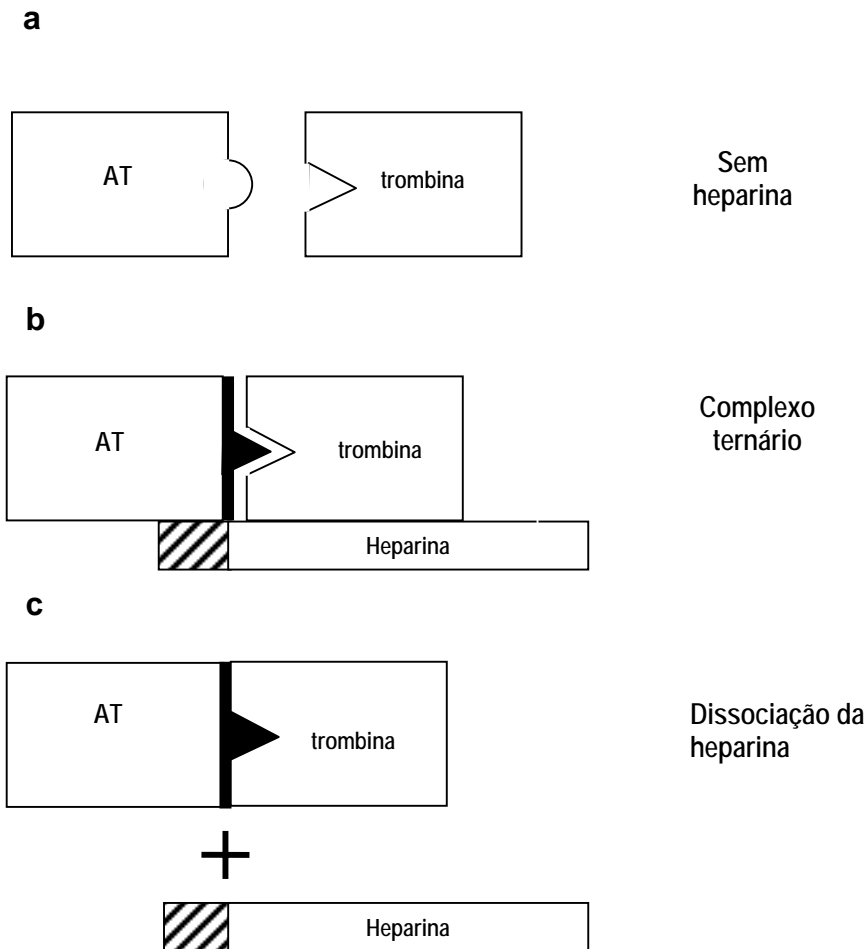


Figura 3. Ação inibidora da heparina: a- A antitrombina inibe lentamente a trombina, na ausência da heparina. b- Ligação da heparina à antitrombina, provocando alteração conformacional nesta e acelerando a velocidade de inibição. c- Dissociação da heparina do complexo, podendo ser reutilizada. Segundo Hirsh *et al* [7].

Andersson *et al* [9], já em 1979, demonstraram que a inibição da trombina pela heparina apresentava relação com o tamanho da molécula de heparina, paralelamente ao que ocorria com o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), ou seja, grandes moléculas inibiam mais eficazmente a trombina e produziam maiores alterações no TTPA. Demonstraram, também, que a inibição do fator Xa pela heparina diferia da

inibição da trombina pela heparina, isto é, a atividade específica anti-Xa aumentava com a diminuição do tamanho da molécula da heparina, indicando que os mecanismos da inibição da trombina e do fator Xa, potencializados pela heparina, não eram os mesmos.

Moléculas de heparina que contêm menos de 18 sacarídeos não se ligam simultaneamente à trombina e à AT e são, portanto, incapazes de catalisar a inibição da trombina. Em contraste, fragmentos pequenos de heparina, que contêm a seqüência pentassacarídica de alta afinidade, catalisam a inibição do fator Xa pela AT [23, 24, 25] (figura 4).

A estrutura pentassacarídica contém uma unidade glicosamina interna, com um único grupo O-sulfato na posição 3, que é crítico para o papel anticoagulante da heparina [14, 26].

Pela inativação da trombina, a heparina não apenas previne a formação de fibrina, como também previne a ativação dos fatores V e VIII, induzida pela trombina. Alguns autores sugerem ser mais importante a ação da heparina inibindo as reações de amplificação catalisadas pela trombina do que inibindo o próprio fator Xa [27, 28, 29] (figura 5).

Existem outros mecanismos de ação antitrombótica exercidos pela heparina, que não são relacionados com a AT. Entre eles, o do cofator II da heparina, que, se combinando com doses altas de heparina, inibe apenas a ação da trombina [30] e não a das outras enzimas da coagulação. O cofator II da heparina pode estar relacionado com a fluidez do sangue no interior de vasos intactos, funcionando como cofator para mucopolissacarídeos, como dermatan sulfato, acelerando também a inibição da trombina [1, 31].

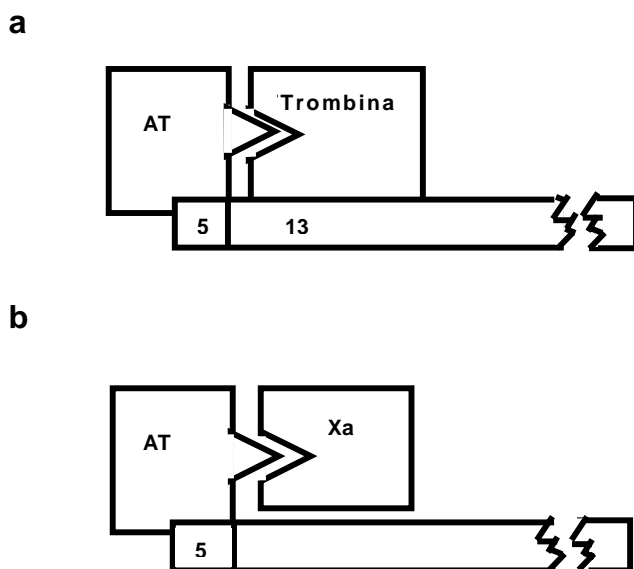


Figura 4 – a. Inibição da trombina requer ligação simultânea da heparina com a AT através da única seqüência pentassacarídica e ligação com a trombina através de um mínimo de treze unidades sacarídicas adicionais. b. Inibição do fator Xa requer ligação da heparina com a AT através da estrutura pentassacarídica exclusivamente. Modificado de Hirsh *et al* [7].

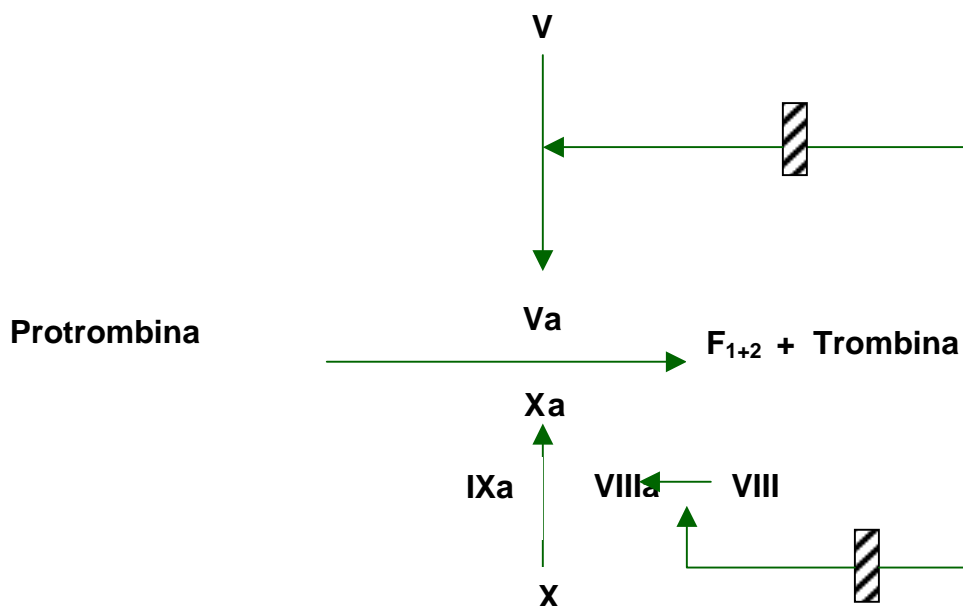


Figura 5 – Pela ação do complexo protrombinase, a protrombina dá origem à trombina e ao fragmento 1+2 (F<sub>1+2</sub>). A trombina formada faz a retroativação dos fatores V e VIII, que é sensível à inibição pela heparina. Segundo Ofosu *et al* [27].

Além disso, a ação antitrombótica da heparina também se manifesta, reduzindo a atividade procoagulante do complexo fator tissular/fator VIIa, pois induz aumento da liberação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI), pelas células do endotélio vascular e, também, induz redistribuição do TFPI, com sua diminuição no espaço intracelular, por ser direcionado para a superfície celular. O TFPI forma um complexo com fator Xa, inativando-o, e este complexo inativa o complexo fator VIIa + fator tecidual [32].

Outro possível mecanismo de ação antitrombótica foi proposto por Nader *et al* [33], que demonstraram que a heparina aumentava, em cerca de 2 a 3 vezes, a síntese de heparan sulfato pelas células endoteliais, em meio de cultura, e que esse aumento ocorria imediatamente após a exposição das células endoteliais à heparina. Demonstraram também que ocorria aumento do grau de sulfatação nos resíduos de ácido urônico do heparan sulfato proveniente destas células.

Pinhal *et al* [34] demonstraram que um tetrassacarídeo pentassulfatado da heparina era o fragmento mínimo do composto capaz de exercer esses efeitos e, em 2001 [35], foi demonstrado que existia uma molécula de 47 kDa, presente nas células endoteliais, que se ligava com alta afinidade à heparina. Esta molécula, provavelmente, seria o receptor ou um dos receptores celulares envolvidos com a sinalização de agentes antitrombóticos, para a produção endotelial de heparan sulfato, aumentando a proteção do vaso contra a formação do trombo. As relações entre a heparina e o sistema fibrinolítico ainda são objetos de algumas controvérsias. O peso das evidências sugere que a heparina não tem efeito direto na lise do coágulo [1].

Entretanto, Pâques *et al* [36] sugeriram que a heparina aumenta a atividade fibrinolítica *in vivo*. Esses autores observaram que, na presença de heparina, ocorria estímulo das atividades plasminogenolítica e fibrinogenolítica dos ativadores do plasminogênio, tecidual (t-PA) e urinário (u-PA), da mesma maneira que ocorre na presença da fibrina. Observaram, também, que ambos os ativadores formavam complexos com a heparina, ligando-se a ela com alta afinidade, sendo que o sítio de ligação da heparina na molécula do t-PA parece ser idêntico ou extremamente relacionado com o sítio de ligação da fibrina ao t-PA. Porém, a importância desse mecanismo ainda não foi esclarecida.

### FARMACOCINÉTICA DA HNF

As vias para administração de HNF são a intravenosa (contínua ou intermitente) e a subcutânea. A administração intramuscular está associada com complicações hemorrágicas locais e por isso essa via é inaceitável [1].

Após injeção intravenosa de 5.000 unidades de heparina, em *bolus*, a meia vida dessa substância é de aproximadamente 60 minutos [1].

Quando a via subcutânea é eleita, a dose inicial deve ser alta o suficiente para superar a baixa biodisponibilidade associada com essa via de administração [37]. O efeito máximo da injeção subcutânea ocorre, aproximadamente, 3 horas após sua administração e permanece por 12 horas ou mais, sendo sua meia-vida dose dependente [1, 38].

Um efeito anticoagulante imediato requer administração intravenosa, propiciando que a atividade antiprotease se manifeste de pronto [7]. Hull *et al* [39] demonstraram que a biodisponibilidade da heparina, no homem, administrada por via intravenosa, é maior do que por via subcutânea, pois os níveis terapêuticos determinados pelo TTPA foram alcançados, após 24 horas, em apenas 37% dos pacientes com TVP que receberam heparina SC, comparados com 71% daqueles que receberam a mesma dose por infusão venosa contínua.

Hirsh *et al* [40], em 1976, demonstraram que grandes variações individuais podem ocorrer em resposta às mesmas doses de heparina, em relação às alterações do TTPA, heparinemia e relação TTPA/heparinemia.

Essas variações são, provavelmente, conseqüentes a diferenças na depuração renal, na taxa de inativação hepática, nos níveis de fatores da

coagulação circulantes e na ligação da heparina às proteínas plasmáticas ou, possivelmente, à combinação desses fatores. A heparina também se liga a células endoteliais e macrófagos, o que também contribui para a complexidade de sua farmacocinética [7].

A heparina é eliminada da circulação por mecanismos saturável e não saturável [38, 41]. O primeiro é constatado por um declínio rápido da heparinemia, sugerindo uma fase de equilíbrio, como resultado da diluição da droga no plasma e de sua distribuição para outros compartimentos [38], envolvendo receptores em endotélio [42] e em células mononucleares havendo, em seguida, rápida internalização, despolimerização e metabolização e, desta maneira, exibindo uma taxa de depuração dose dependente, com a meia vida aumentada de acordo com o aumento da dose [1, 41, 43]. A forma não saturável é lenta e dependente da função renal [7].

Após administração de baixas doses (10 UI a 5.000 UI), a excreção da droga pela urina ocorre sob a forma de moléculas com diferentes graus de sulfatação, possivelmente pela ação de endoglicosidase no rim, sendo que parte das moléculas parcialmente dessulfatadas retém 50% da atividade anticoagulante. Após administração de doses mais altas, moléculas intactas de heparina podem ser encontradas na urina, com atividade anticoagulante total. Portanto, o desaparecimento da atividade anticoagulante segue uma cinética não linear, o que pode ser explicado pela combinação de mecanismos saturável e não saturável [38].

A depuração da heparina é influenciada pelo comprimento da cadeia de suas moléculas, com as porções de alto peso molecular sendo eliminadas



da circulação mais rapidamente que as porções de baixo peso molecular. Esta depuração resulta no acúmulo de porções de baixo peso molecular, as quais possuem uma maior razão de atividade anti-Xa/anti-IIa. As moléculas de baixo peso molecular, que são retidas *in vivo*, são mensuradas pela atividade anti-Xa e causam pequeno efeito no TTPA [7].

A heparina é usualmente administrada sob a forma de sais sódicos ou cálcicos. Discussões aconteceram sobre prováveis diferenças na eficácia antitrombótica desses sais, na profilaxia e tratamento de doenças tromboembólicas. Atualmente, sabe-se que não há diferença substancial na frequência de trombose pós-operatória, em complicações hemorrágicas e em reações locais, quando se comparam sais de heparina cálcica e sódica [44, 45].

### **MONITORIZAÇÃO LABORATORIAL**

Como a resposta anticoagulante à heparina apresenta variações individuais, a monitorização laboratorial é importante para ajustar a dose, sendo o TTPA o método mais utilizado por ser sensível aos efeitos inibitórios da heparina sobre a trombina, o fator Xa e fator o IXa [7]. A estreita relação entre o efeito da heparina, *ex vivo*, no TTPA e seu efeito clínico foi observada em vários estudos retrospectivos [39, 46, 47, 48, 49, 50].

Basu *et al* [48] demonstraram que, a dose de heparina era eficaz e relativamente segura quando causava um prolongamento no TTPA, entre uma vez e meia e duas vezes e meia o valor normal, impedindo recorrência

de trombose venosa profunda e evitando a tromboembolia pulmonar, sendo que 8% dos pacientes apresentaram sangramento. Nesse trabalho, a recorrência de trombose ocorreu quando o TTPA estava abaixo desses valores.

Arnout *et al* [49] demonstraram que, após terapêutica trombolítica, no infarto agudo do miocárdio, a associação de heparinoterapia manteve 90% das artérias coronárias pérvias, quando se atingia TTPA correspondente a duas vezes o normal. Kaplan *et al* [50] demonstraram que o nível de anticoagulação, determinado pelo TTPA, era inversamente proporcional à frequência de reoclusão, quando a heparina era associada à estreptoquinase, na terapêutica trombolítica do infarto agudo do miocárdio. Porém, nem todos os episódios de reoclusão foram impedidos na vigência da anticoagulação mantida nesses níveis. Já, os episódios hemorrágicos ocorreram 24 horas após a trombólise, o que levou os autores a sugerirem que a trombólise tenha sido a principal responsável por estes eventos. Não se pode, entretanto, excluir a hipótese de que esse sangramento tenha sido conseqüente à associação daquelas duas drogas.

Visando à manutenção de níveis terapêuticos adequados, atingidos em curto intervalo de tempo, após o início do tratamento, nomogramas têm sido implementados em alguns hospitais, com boa aceitação pelos médicos. Essa diminuição do intervalo de tempo para se atingir o TTPA ideal tem sido relacionada com menores incidências de falha no tratamento e não apresenta relação com aumento nos índices de hemorragias [51].

## *Limitações da heparinoterapia e uso clínico*

Nos casos em que existe dificuldade para se alcançarem os níveis de TTPA desejados, como acontece quando há resistência à heparina e nos indivíduos portadores de anticoagulante lúpico ou com deficiência dos fatores de contato da coagulação, pode ser determinada a heparinemia pela quantificação da atividade anti-Xa [52].

### **LIMITAÇÕES DA HEPARINOTERAPIA**

Suas limitações farmacocinéticas são causadas pelas ligações da heparina com proteínas plasmáticas, proteínas liberadas pelas plaquetas e células endoteliais, resultando em uma resposta anticoagulante variável e no fenômeno de resistência à heparina [7].

Suas limitações biofísicas ocorrem devido à inabilidade da heparina em inativar fator Xa do complexo protrombinase e inativar a trombina ligada à fibrina ou a superfícies subendoteliais [7].

Já, a trombocitopenia e a osteopenia induzidas pela heparina são as chamadas complicações biológicas [53].

### **USO CLÍNICO DA HEPARINA**

A heparina é efetiva para prevenção e tratamento das trombozes arteriais, venosas, da embolia pulmonar e de trombozes em câmaras cardíacas. É também empregada no tratamento de pacientes com angina instável e infarto agudo do miocárdio e em alguns casos iniciais de coagulação intravascular disseminada (CIVD) [53]. A utilização da heparina é indispensável durante cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea,

hemodiálise, cirurgia vascular, angioplastia e colocação de *stents* e endopróteses vasculares [7].

### **HEPARINAS DE BAIXO PESO MOLECULAR**

As heparinas de baixo peso molecular (HBPM) são frações ou fragmentos da heparina. As frações de baixo peso molecular são separadas do complexo polissacarídico por extração com solvente ou por gel filtração. Já os fragmentos são obtidos por meio de clivagem, química ou enzimática, aplicada à substância original, antes da separação física. Clivagem hidrolítica da heparina é geralmente realizada através de oxidação com diferentes agentes [26].

A grande expectativa da fragmentação da heparina foi a obtenção de substâncias que apresentassem vantagens farmacocinéticas em relação à HNF, além de possuírem grande efeito antitrombótico relacionado à sua atividade anti-Xa [26] e, talvez, menor efeito hemorrágico relacionado à atividade anti-IIa. Sabe-se, entretanto, que não é exclusivamente a atividade anti-Xa que determina o efeito antitrombótico [54] nem a menor atividade anti-IIa que determina a baixa probabilidade de sangramento [55].

Esta expectativa, entretanto, não foi totalmente concretizada, pois preparações de heparina que continham moléculas grandes com alguma ação antitrombina pareciam ser mais efetivas como agentes antitrombóticos [55]. Os mesmos autores demonstraram a importância da inibição da trombina para a expressão da atividade anticoagulante de várias substâncias e mensuraram a potência anticoagulante (definida como a

## *Heparinas de baixo peso molecular*

habilidade de cada polissacarídeo sulfatado em inibir a geração de trombina) da HNF, da HBPM, bem como do pentosan polissulfato e do dermatan sulfato. Concluíram que as heparinas com atividade predominante anti-Xa são inibidoras relativamente fracas da geração de trombina, demonstrando que a HBPM não inibia essa proteína em intensidade comparável à inibição provocada pela HNF [55].

Holmer *et al* [56], em 1982, testaram HNF e fragmentos de heparina com diferentes pesos moleculares na prevenção de trombos induzidos, experimentalmente, em veia jugular de coelhos, constatando que doses equivalentes destes fragmentos, em relação à atividade anti-Xa, apresentavam atividades antitrombóticas marcadamente diferentes. Altas doses de pequenos fragmentos foram necessárias para produzir proteção similar à promovida pela HNF. Concluíram, desta maneira, que os fragmentos com atividade anti-Xa devem ter um limite mínimo de peso molecular, abaixo do qual não apresentam boa atividade antitrombótica.

As HBPM são administradas por via subcutânea e são, ao menos, tão efetivas e seguras quanto a HNF [10, 26, 37, 57, 58]. As HBPM têm algumas vantagens em relação à HNF, entre elas, a biodisponibilidade e ausência de necessidade de monitorização laboratorial, na maioria dos pacientes [59, 60]. Apresentam, entretanto, a desvantagem de terem um custo mais alto.

A literatura apresenta dados conflitantes em relação à atividade antitrombótica e ao sangramento induzido pelas HBPM.

Alguns autores concluíram que, em animais de experimentação, frações de heparina com aproximadamente 5.000 dáltons podiam prevenir

a formação ou a extensão de trombos tão efetivamente quanto a HNF, com menor tendência hemorrágica [56, 61]. Carter *et al* [61] demonstraram tempo de sangramento menor em orelhas de coelhos injetados com HBPM do que naqueles que receberam HNF. Holmer *et al* [56] demonstraram que, para a obtenção de um mesmo efeito antitrombótico, eram necessárias doses maiores de fragmentos do que de HNF, concluindo que não há correlação entre os níveis plasmáticos de anti-Xa e a atividade antitrombótica e que a presença de componentes de alta afinidade era absolutamente necessária para uma significativa atividade antitrombótica, em animais de laboratório submetidos à indução de trombose por estase venosa.

As HBPM inibem os fatores Xa e IIa na razão de 3/1 a 5/1, enquanto a HNF inibe esses fatores na razão 1/1; porém alguma atividade anti-IIa é detectada nas HBPM, evidenciando que existem algumas moléculas com, ao menos, 18 sacarídeos. Entretanto, não é exclusivamente a atividade anti-Xa que determina o efeito antitrombótico das HBPM nem exclusivamente a atividade anti-IIa que manifesta uma boa predição de seu efeito hemorrágico [26].

### **PESO MOLECULAR E ATIVIDADE**

Dependendo de sua preparação, as HBPM podem ter peso molecular entre 2.000 e 10.000 dáltons, com média de 4.000 a 6.000 dáltons [62, 63] e conter de 13 a 22 açúcares [64]. Todas as HBPM são, atualmente, extraídas de mucosa intestinal porcina e, com exceção da nadroparina, que é um sal cálcico, todas as demais são sais sódicos [62, 63].

## Peso molecular e atividade

Dos vários métodos de obtenção das HBPM resultam compostos que exibem marcantes diferenças em relação às suas estruturas físico-químicas, natureza dos sais, pesos moleculares, distribuição dos pesos moleculares e densidade (tabela 1).

Tabela 1 – Algumas HBPM disponíveis comercialmente, em diferentes países, métodos de preparação, peso molecular (pm) médio e razão anti-Xa/anti-IIa

Agentes	Método de Preparação	pm médio (dáltons)	Razão Anti-Xa/Anti-IIa
Nadroparina cálcica*	Despolimerização em ácido nitroso	4.500	3,6
Enoxaparina sódica*	Benzilação seguida por despolimerização alcalina	4.200	3,8
Dalteparina*	Despolimerização em ácido nitroso	6.000	2,7
Ardeparina	Despolimerização peroxidativa	6.000	1,9
Tinzaparina	Despolimerização enzimática com heparinase	4.500	1,9
Reviparina	Despolimerização em ácido nitroso	4.000	3,5

\*HBPM disponíveis no Brasil  
Modificado de Hirsh *et al* [7] e Weitz [59].

Essa heterogeneidade pode contribuir para os diferentes perfis clínicos e biológicos observados e potências anticoagulante e anti-Xa *in vitro*, relação anti-Xa/anti-IIa, atividade antitrombótica e efeito hemorrágico em animais de experimentação e em pacientes [65]. Por essa razão, a generalização

dos resultados obtidos em estudos com um tipo específico de HBPM não deve ser feita [66]; pelo mesmo motivo, as HBPM não podem ser intercambiadas clinicamente [7].

Devido à pouca ligação das moléculas de baixo peso molecular com a protamina, apenas a atividade anti-IIa das HBPM é quase totalmente revertida, enquanto a atividade anti-Xa não é completamente neutralizada. A dose de 1 mg de protamina para cada 100 unidades da tinzaparina reverte 90% da atividade anti-IIa e 60% da atividade anti-Xa [67].

As HBPM com peso molecular menor do que 5.400 dáltons têm, principalmente, atividade anti-Xa, já as que possuem peso molecular maior do que 5.400 dáltons, podem apresentar alguma atividade anti-IIa [63].

### **MECANISMO DE AÇÃO**

As HBPM também exercem sua atividade através da ativação da AT. Sua interação com a AT é mediada por uma única seqüência pentassacarídica [13, 17], presente em menos de um terço das moléculas das HBPM [7]. Com a diminuição do peso molecular, a capacidade para inibir a trombina diminui [68], porque moléculas com menos de 18 sacarídeos não são capazes de formar o complexo ternário heparina-AT-trombina. Conseqüentemente, ao contrário da HNF, que contém equivalência nas atividades anti-Xa e anti-IIa, as HBPM têm maior atividade relativa anti-Xa [59]. Uma vez que, a ligação entre AT e fator Xa é menos crítica para a atividade anti-Xa, os pequenos fragmentos inativam o fator Xa quase tão bem quanto as grandes moléculas [9].



É possível que alguma atividade anti-IIa possa ser detectada nas preparações de HBPM, porém a avaliação dessa atividade é geralmente subestimada, uma vez que ensaios cromogênicos geralmente utilizados são insensíveis para mensurar baixas concentrações de atividade antitrombina, concentrações essas que podem ser relevantes para a eficácia das HBPM [68].

As HBPM também promovem liberação do TFPI a partir das células endoteliais, o que pode contribuir para o controle da via do fator VII/Fator tissular, acelerando a formação do complexo TFPI-FXa [32, 69, 70, 71]. Aumento de TFPI ocorre de maneira similar após injeção subcutânea de HNF ou de HBPM (enoxaparina), enquanto aumento na atividade anti-Xa é muito maior após administração de HBPM. Por essa razão, *Bara et al* [72] sugeriram que a liberação do TFPI pode ser conseqüente a fragmentos diferentes dos responsáveis pelo aumento da atividade anti-Xa.

Dois outros mecanismos foram levantados para explicar o maior efeito anti-Xa das HBPM em relação à HNF: 1) o fator plaquetário 4 (F4), liberado durante a coagulação, não inibe a ação de oligossacarídeos, ao contrário do que ocorre com polissacarídeos [73]; 2) o fator Xa, ligado à membrana plaquetária no complexo protrombinase, pode ser inativado pelas HBPM, ao contrário do que ocorre com a HNF [28, 74].

### FARMACOCINÉTICA

As HBPM produzem, no ser humano, uma resposta anticoagulante mais previsível, em consequência de sua maior biodisponibilidade, maior meia-vida e depuração dose independente [59, 64]. A meia-vida da atividade anti-Xa das HBPM varia entre 3 e 10 minutos após injeção intravenosa [68] e entre 2 e 4 horas após injeção subcutânea [72], mas essa atividade ainda pode ser detectada por até 12 horas ou mais [10, 64, 68], apresentando variação também entre uma e outra HBPM. Grande biodisponibilidade, com maior meia vida biológica foi observada por Palareti *et al* [75], os quais utilizaram, em pacientes, aplicação única diária durante o período pós-operatório de cirurgia ginecológica, com intuito profilático. Após duas aplicações diárias de HBPM, durante vários dias, existiu um aumento considerável da meia vida da atividade anti-Xa [10].

A depuração plasmática da atividade anti-IIa (talvez pela neutralização pelo F4) é mais rápida do que a depuração da atividade anti-Xa, o que é verdade tanto para as HBPM como para a HNF, sendo essa diferença mais acentuada para as HBPM [72]. Este fato reflete a maior rapidez de depuração das cadeias maiores de heparina [59].

As diferenças farmacocinéticas entre a HNF e as HBPM podem ser explicadas pela menor ligação das HBPM às proteínas plasmáticas [10], como a glicoproteína rica em histidina, a vitronectina, a fibronectina [76], o F4 [25, 77], os multímeros de alto peso molecular do fator de von Willebrand [78, 79] e o fator VIII, sendo essas duas últimas proteínas, algumas das que reagem em respostas de fase aguda [64].

Contribuem, também, para essas diferenças, a menor taxa de ligação das HBPM às células endoteliais [80, 81], com conseqüente diminuição de sua internalização e despolimerização por enzimas lisossômicas [82]. Young *et al* [81] demonstraram, em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana, estimuladas com trombina, que as HBPM possuem baixa afinidade às células endoteliais e, desta maneira, a ligação e conseqüente internalização parecem exercer um papel mínimo na depuração das HBPM.

Foi observada interferência pequena ou ausente das HBPM sobre as plaquetas, *in vivo* e *in vitro* [31, 83, 84, 85]. A interação entre plaquetas e moléculas de heparina com menos de 5.000 dáltons é reduzida, especialmente em preparações que contêm moléculas com alta afinidade à AT [31]. Uma possível explicação seria que as moléculas de baixo peso molecular não são grandes o suficiente para se ligarem às plaquetas e à AT ao mesmo tempo [85]. Xiao e Théroux [84] observaram que a enoxaparina não produzia ativação plaquetária *in vitro*, quando quantificaram, através de citometria de fluxo, a expressão de P-selectina plaquetária (CD 62) e GP IIb-IIIa ativada na membrana plaquetária, bem como quando observaram reduzida agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas, de indivíduos portadores de angina instável, o que ocorria em indivíduos tratados com HNF. Já, Ageno *et al* [86] referem que, quando compararam grupos de pacientes portadores de síndrome coronariana aguda, tratados com HBPM ou HNF, menor incidência de pequenos sangramentos foi encontrada quando utilizaram HBPM.

Portanto, é por esses aspectos que se explica a melhor

biodisponibilidade das HBPM e, conseqüentemente, sua resposta anticoagulante previsível, quando sua dose é ajustada de acordo com o peso do indivíduo, não necessitando de monitorização laboratorial [64].

Após administração subcutânea, a taxa de eliminação das HBPM é uma combinação da difusão da droga na corrente sangüínea, somada, principalmente, à eliminação que ocorre via filtração renal. Por isso, a monitorização laboratorial é necessária em indivíduos com insuficiência renal [87].

Collignon *et al* [88] compararam os perfis farmacocinéticos de três heparinas de baixo peso molecular, dalteparina, enoxaparina e nadroparina, e demonstraram que estas exibem padrões farmacocinéticos e características físico-químicas significativamente diferentes entre si, além de possuírem diferentes padrões de excreção renal, explicando por que os valores de meia-vida de eliminação são diferentes. Desta maneira, são consideradas drogas diferentes e não devem ser intercambiadas entre si.

### **MONITORIZAÇÃO LABORATORIAL**

Retomando o que já foi citado, as propriedades farmacocinéticas das HBPM conferem a elas uma curva dose-resposta que tende a ser linear e seu conseqüente efeito anticoagulante, altamente previsível, dispensa a necessidade de monitorização laboratorial durante sua utilização [7, 10, 30, 59, 60, 64], exceto em situações especiais, como em indivíduos com alteração da função renal [87].

Outros pacientes tratados com HBPM também podem beneficiar-se da

monitorização laboratorial, como aqueles que apresentam alto risco de sangramento, gestantes, crianças, grandes obesos e indivíduos com alto risco de recorrência de trombose, como os portadores de síndrome de Trousseau, síndrome do anticorpo antifosfolípide e de distúrbios mieloproliferativos [60].

A avaliação laboratorial mais sensível para determinar o efeito anticoagulante das HBPM é a mensuração da sua concentração plasmática através da determinação da atividade anti-Xa [60, 64]. O método cromogênico é o teste de escolha para essa avaliação. O intervalo terapêutico da atividade anti-Xa, em indivíduos tratados devido à tromboembolia, com 2 aplicações diárias, deve ser entre 0,5 e 1,0 UI/ml, e o sangue deve ser colhido 4 horas após a administração da droga. O TTPA, embora possa estar discretamente prolongado, não é útil para esta monitorização [60].

### **APLICAÇÕES CLÍNICAS**

As HBPM têm indicação para prevenção de trombose venosa em cirurgia geral, ginecológica, ortopédica, neurocirurgia, em politraumatismo, bem como em pacientes clínicos. Essa indicação é mais importante para indivíduos de alto risco, como os submetidos à cirurgia ortopédica e para os pacientes portadores de câncer. Têm indicação também para tratamento de trombose venosa estabelecida, síndromes coronarianas agudas, como angina instável e infarto não Q, infarto agudo do miocárdio e nas angioplastias [7, 59, 86, 89]. É indicada também para o tratamento de

## *Complicações do tratamento heparínico*

tromboembolia pulmonar [90, 91].

As HBPM podem ser uma alternativa útil no tratamento prolongado dos distúrbios tromboembólicos em gestantes, indivíduos com grande risco de interação medicamentosa, como os que fazem uso de quimioterapia, pacientes que apresentam contra-indicações para a utilização de dicumarínicos, incluindo as reações de hipersensibilidade, pacientes nos quais a monitorização laboratorial seja de difícil realização, como alcoolistas crônicos e portadores de distúrbios psiquiátricos [59, 92].

### **COMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO HEPARÍNICO**

#### **Hemorragia**

O principal efeito colateral das heparinas é o sangramento, o qual tem sido freqüentemente relacionado ao seu efeito anticoagulante, sendo então inevitável. Porém, o efeito hemorrágico pode estar relacionado com a dose da heparina, com a resposta anticoagulante do indivíduo, com o método de administração da droga e com outros fatores relacionados ao paciente, como por exemplo, sexo feminino, doenças associadas, associação de terapia trombolítica e reduzidos níveis de hemoglobina na admissão hospitalar [93].

Entretanto, alguns estudos não demonstraram relação entre sangramento e efeito anticoagulante da HNF, já que sangramentos maiores, foram observados na vigência de intervalos considerados “terapêuticos” do TTPA [48, 49]. Têm-se considerado sangramentos maiores os que causam diminuição nos níveis de hemoglobina maior ou igual a 2 g/dl, sangramento intraperitoneal, intracraniano ou se o sangramento resultar na

## *Complicações do tratamento heparínico*

transusão de duas ou mais unidades de concentrado de glóbulos vermelhos [94].

Alteração do TS na vigência da heparinoterapia com HNF foi observada por alguns autores [95, 96]. Essa alteração pode ser conseqüente a alterações plaquetárias ou da parede vascular. Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicá-la:

- **Alterações plaquetárias**

- ▶ Diminuição da agregação plaquetária conseqüente à inibição da trombina pela heparina [97]. Na presença de antitrombina, a heparina, inibindo a trombina, bloqueia a ativação de todas as atividades plaquetárias induzidas pela trombina, incluindo geração de prostaglandinas e tromboxanas, elevação da concentração citoplasmática de cálcio livre, mudança na forma, secreção do conteúdo dos grânulos, ligação com fibrinogênio e agregação [1]. Fernandez *et al* [98] sugeriram também que a heparina poderia inibir a produção de trombina na superfície plaquetária, via inibição do fator Va ou através de outro efeito na plaqueta *per se* até então inexplicado.

- ▶ Alteração nas propriedades hemostáticas plaquetárias, independente do efeito da heparina sobre a coagulação do plasma, mecanismo proposto por Heiden *et al* [96] que, em experimento com voluntários sadios, observaram aumento significativo do TS após administração de HNF e diminuição significativa da liberação plaquetária de serotonina, *ex vivo*, em resposta ao colágeno, epinefrina

## *Complicações do tratamento heparínico*

e ADP.

► Inibição das funções hemostáticas plaquetárias dependentes do FvW pela ligação direta da heparina a esse fator em solução, interferindo com sua ligação a GPIb na superfície plaquetária, desde que o sítio de ligação do FvW com a heparina coincide, em parte, com o domínio de ligação para o receptor plaquetário GPIb [78].

- **Alteração da parede vascular**

Alguns autores observaram que heparina, como outros glicosaminoglicanos sulfatados, tinha um importante efeito anti-hemostático quando aplicada topicamente à ferida em pele, promovendo aumento do sangramento de pequenos vasos e capilares [95, 99, 100]. Já, em 1989, Nader *et al* [33] observaram que a atividade inibitória do processo hemostático conseqüente à adição, a tecidos lesados de ratos, de moléculas de heparina ou simplesmente de dissacarídeos derivados do heparan sulfato, contendo um sulfato na posição C6, na metade glicosamina, poderia ser revertida pela adição de adenosina trifosfato (ATP), que deslocaria a heparina ligada ao receptor celular. Alguns estudos demonstraram que o ATP e a adenosina difosfato (ADP), em baixas concentrações, eram hábeis para deslocar a heparina ligada a receptores teciduais e reverter sua atividade inibitória. Estudos experimentais demonstraram que a heparina inibia competitivamente a hidrólise do ATP pela miosina ATPase [99]. Os autores interpretaram



## *Complicações do tratamento heparínico*

estes resultados combinadamente, supondo que a heparina se ligava a uma molécula similar à miosina das células musculares lisas dos vasos, inibindo sua contratilidade e aumentando o sangramento [101].

Atualmente, não existe concordância entre os dados disponíveis na literatura, em relação à incidência e magnitude de sangramentos associados com a utilização de HBPM. Alguns estudos [37, 75] sugerem que a utilização de HBPM está associada com menor incidência e magnitude de sangramentos. Outros, não encontraram diferenças na incidência de sangramento quando compararam grupos de pacientes tratados com HBPM com grupos tratados com HNF ou com placebo [57, 89, 102]. Sangramentos fatais foram relatados com a utilização de HBPM [103, 104, 105].

### **Trombocitopenia induzida pela heparina (TIH)**

Trombocitopenia induzida pela heparina (TIH) é um efeito adverso imunomediado, definido como diminuição na contagem plaquetária em mais de 50% em relação à contagem inicial ou contagem plaquetária menor do que  $100.000/\text{mm}^3$  em duas medições consecutivas, que ocorre tipicamente após 5 ou mais dias do início da heparinoterapia [106], seguido de um consecutivo aumento dentro de 8 dias após a interrupção da utilização da droga [107]. A TIH pode ocorrer sem outras manifestações clínicas ou ser acompanhada por trombozes arteriais ou venosas. Deve-se excluir outras causas de trombocitopenia, como perda sanguínea, trombocitopenia

## *Complicações do tratamento heparínico*

induzida por outras drogas, quimioterapia, púrpura trombocitopênica idiopática, púrpura pós-transfusional, síndrome do anticorpo antifosfolípide e coagulação intravascular disseminada [107].

Suspeita-se que o alvo antigênico dos anticorpos da classe IgG seja um complexo multimolecular, formado pelo F4 e pela heparina [108]. Esse imunocomplexo ativa as plaquetas, por meio do receptor Fc, produzindo agregação plaquetária e, conseqüentemente, trombocitopenia e/ou trombose [106, 109].

Warkentin *et al* [110] descreveram a incidência de TIH em indivíduos submetidos à cirurgia de quadril, que utilizaram HNF ou HBPM na profilaxia contra distúrbios tromboembólicos e verificaram diminuição desta complicação quando utilizaram HBPM (2,7% com HNF x 0% com HBPM). Observaram também que a freqüência do aparecimento dos anticorpos, mesmo na ausência da TIH, foi maior nos indivíduos que receberam HNF. Resultados concordantes foram obtidos em estudo multicêntrico, onde Lindhoff-Last *et al* [107] também encontraram menor incidência de TIH em indivíduos tratados com HBPM, comparados a indivíduos tratados com HNF, no período definido como de tratamento curto (5 a 7 dias) e menor incidência de anticorpos detectados após 28 dias nos indivíduos tratados com HBPM.

A TIH foi, inicialmente, mais freqüentemente associada ao uso da heparina proveniente de pulmão bovino, mas estudos subseqüentes não demonstraram qualquer diferença na incidência dessa complicação, com essa ou com a heparina provinda do intestino porcino [1].

## *Complicações do tratamento heparínico*

Hoje, as heparinas utilizadas são apenas de origem porcina devido ao risco de contaminação dos materiais biológicos de origem bovina.

É importante enfatizar que as HBPM não devem ser utilizadas para o tratamento dos distúrbios tromboembólicos quando ocorre TIH, em indivíduos previamente tratados com HNF, devido à extensiva reação cruzada entre as duas formas de heparina [7].

### **Osteoporose**

HNF ou HBPM são geralmente administradas por curto período de tempo quando um imediato efeito anticoagulante é necessário, sendo o tratamento continuado com os dicumarínicos. Entretanto, durante a gestação, a utilização de HNF ou HBPM é preferida para prevenção e tratamento de tromboembolismo, prevenção de embolia sistêmica secundária à presença de válvulas cardíacas metálicas e prevenção de perda fetal na vigência de anticorpo antifosfolípide. Nessas e em outras circunstâncias nas quais a heparinoterapia é indicada por longos períodos, existe o risco de osteoporose [92, 111, 112, 113].

Redução significativa da densidade óssea foi relatada em 30% dos indivíduos e fraturas vertebrais sintomáticas ocorreram entre 2 e 3% dos pacientes que receberam heparina por períodos maiores do que um mês. A incidência de fraturas vertebrais em mulheres recebendo heparina, durante a gestação, foi de 2,2% [114].

Estudos em animais, como com ratos Sprague-Dawley, têm demonstrado que o tratamento com heparina está associado com diminuição do número de

---

## *Complicações do tratamento heparínico*

osteoblastos, diminuição na quantidade de colágeno não mineralizado (osteóide) e aumento na superfície dos osteoclastos, indicando que a heparina causa perda óssea por diminuição na taxa de formação e aumento na reabsorção óssea [115].

Monreal *et al* [92] demonstraram que fraturas vertebrais ocorrem menos freqüentemente em indivíduos tratados por longo prazo com HBPM do que em indivíduos tratados com HNF (15% x 2,5%).

Novos anticoagulantes estão sendo extensivamente estudados, visando melhoria da terapêutica antitrombótica [116]. Entretanto, a HNF e as HBPM continuam sendo, até o momento, as drogas de escolha quando se necessita efeito antitrombótico imediato.

**BIBLIOGRAFIA**

- [1] Salzman EW, Hirsh J, Marder VJ. Clinical use of heparin. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed) Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p. 1584-91.
- [2] Mueller RL, Scheidt S. History of drugs for thrombotic disease: discovery, development, and directions for the future. *Circulation* 1994;89:32-49.
- [3] McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol* 1916;41:250-7. Apud Salzman EW, Hirsh J, Marder VJ. Clinical use of heparin. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed) Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p. 1584-91.
- [4] Jorpes JE. Heparin in the treatment of thrombosis: An account of its chemistry, physiology and application in Medicine, 2<sup>nd</sup> ed. London, Oxford University Press, 1946. Apud Salzman EW, Hirsh J, Marder VJ. Clinical use of heparin. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed) Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p. 1584-91.
- [5] Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. *Am J Physiol* 1939;125:683-7.

- [6] Abildgaard U. Highly purified antithrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:89-91.
- [7] Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Chest* 2001;119:64-94.
- [8] Lindahl U, Bäckström G, Höök M, Thunberg L, Fransson LA, Linker A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3198-202.
- [9] Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Söderström G. Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X: effect of heparin neutralization in plasma. *Thromb Res* 1979;15:531-41.
- [10] Harenberg J. Pharmacology of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost* 1990;16(suppl):12-8.
- [11] Rosenberg RD, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1218-22.
- [12] Rosenberg RD, Bauer KA. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed) *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p. 837-60.
- [13] Casu B, Orest P, Torri G, Zoppetti G, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinay P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and <sup>13</sup>C nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem J* 1981;

97:599-609.

[14] Holmer E, Söderberg K, Bergqvist D, Lindahl U. Heparin and its low molecular weight derivatives: anticoagulant and antithrombotic properties. *Haemostasis* 1986;16(suppl 2):1-7.

[15] Machovich R. Mechanism of action of heparin through thrombin on blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1975;412:13-7.

[16] Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973;248:6490-505.

[17] Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G. Structure-activity relationship in heparin: A synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:492-9.

[18] Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69:570-7.

[19] Machovich R, Blaskó G, Pálos L. Abstr 9<sup>th</sup> Meet. FEBS 1974; p. 75.

[20] Li HE, Orton C, Feinman DR. The interaction of thrombin and heparin. Proflavine dye binding studies. *Biochemistry* 1974;13:5012-7.

[21] Machovich R, Arányi P. Effect of heparin on thrombin inactivation by antithrombin-III. *Biochem J* 1978;173:869-75.

[22] Jordan RE, Oosta GM, Garnel WT, Rosenberg RD. The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J Biol Chem* 1980;255:10073-80.

[24] Lindahl U, Thunberg L, Bäckström G, Riesenfeld J, Nordling K, Björk I.

Extension and structural variability of thrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1984;259:12368-74.

[25] Lane DA, Denton J, Flynn AM, Thunberg L, Lindahl U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem J* 1984;218:725-32.

[26] Coccheri S. Low molecular weight heparins: an introduction. *Haemostasis* 1990;20(suppl 1):74-80.

[27] Ofosu FA, Sie P, Modi GJ, Fernandez F, Buchanan MR, Blajchman MA, Boneu B, Hirsh J. The inhibition of thrombin-dependent feedback reactions is critical to the expression of anticoagulant effects of heparin. *Biochem J* 1987;243:579-88.

[28] Béguin S, Lindhout T, Hemker HC. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb Haemost* 1988;60:457-62.

[29] Ofosu FA, Hirsh J, Esmon CT, Modi GJ, Smith LM, Anvari N, Buchanan MR, Fenton JW, Blajchman MA. Unfractionated heparin inhibits thrombin-catalyzes amplification reactions of coagulation more efficiently than those catalyzes by factor Xa. *Biochem J* 1989;257:143-50.

[30] Turpie AGG. Pharmacology of low molecular weight heparins. *Am Heart J* 1998;135:329-35.

[31] Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, Lindon JN, Favreau L. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J Clin Invest* 1980;65:64-73.

[32] Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1988;50:803-13.



- [33] Nader HB, Buonassisi V, Colburn P, Dietrich CP. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cell. *J Cel Physiol* 1989;140:305-10.
- [34] Pinhal MAS, Santos IAN, Silva IF, Dietrich CP, Nader HB. Minimum fragments of the heparin molecule able to produce the accumulation and change of the sulfation pattern of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. *Thromb Haemost* 1995;74:1169-74.
- [35] Pinhal MAS, Trindade ES, Fareed J, Dietrich CP, Nader HB. Heparin and a cyclic octaphenol-octasulfonic acid (GL-522-Y-1) bind with high affinity to a 47-kDa protein from vascular endothelial cell surface and stimulate the synthesis and structural changes of heparan sulfate proteoglycan. *Thromb Res* 2001;103:35-45.
- [36] Pâques EP, Stöhr HA, Heimbürger N. Study on the mechanism of action of heparin and related substances on the fibrinolytic system: relationship between plasminogen activators and heparin. *Thromb Res* 1986;42:797-807.
- [37] Hull RD, Raskob GE, Pineo GF, Green D, Trowbridge AA, Elliott CG, Lerner RG, Hall J, Sparling T, Brettell HR, Norton J, Carter CJ, George R, Merli G, Ward J, Mayo W, Rosenbloom D, Brant R. Subcutaneous low-molecular-weight heparin compared with continuous intravenous heparin in the treatment of proximal veins thrombosis. *N Engl J Med* 1992;326:975-82.
- [38] Swart CAM, Nijmeyer B, Roelofs JMM, Sixma JJ. Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. *Blood* 1982;60:1251-8.

- [39] Hull RD, Raskob GE, Hirsh J, Jay RM, Leclerc JR, Geerts WH, Rosenbloom D, Sackett DL, Anderson C, Harrison L, Gent M. Continuous intravenous heparin compared with intermittent subcutaneous heparin in the initial treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1986;315:1109-14.
- [40] Hirsh J, van Aken WG, Gallus AS, Dollery CT, Cade JF, Yung WL. Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism. *Circulation* 1976;53:691-5.
- [41] McAvoy TJ. Pharmacokinetic modelling of heparin and its clinical implications. *J Pharmacokin Biopharm* 1979;7:331-54
- [42] Glimelius B, Busch C, Höök M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. *Thromb Res* 1978;12:773-82.
- [43] Benacerraf B, Miescher P. Bacterial phagocytosis by the reticuloendothelial system in vivo under different immune conditions. *NY Acad Sci* 1960;88:184-95.
- [44] Bergqvist D, Hallböök T. A comparison between subcutaneous low-dose sodium and calcium heparin. *Acta Chir Scand* 1978;339-42.
- [45] Allen JG, Arendrup H, Toftgaard C, Madsen EM, Sorensen S, Lindegaard P. Calcium heparin or sodium heparin in low-dose heparin prophylaxis. *Thromb Haemost* 1979;42:1064.
- [46] Turpie AGG, Robinson JG, Doyle DJ, Mulji AS, Mishkel GJ, Sealey BJ, Cairns JA, Skingley L, Hirsh J, Gent M. Comparison of high-dose with low-dose subcutaneous heparin to prevent left ventricular mural thrombosis in

patients with acute transmural anterior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1989;320:352-7.

[47] Camilleri JF, Bonnet JL, Bouvier JL, Levy G, Djiane P, Bory M, Serradimigni A. Intravenous thrombolysis in myocardial infarction. Influence of the quality of the anticoagulation on the early recurrence rate of angina or infarction. *Arch Mal Coeur* 1988;81:1037-41.

[48] Basu D, Gallus AS, Hirsh J, Cade J. A prospective study of value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med* 1972;287:324-7.

[49] Arnout J, Simoons ML, de Bono D, Rapold HJ, Collen D, Verstraete M. Correlation between the intensity of heparinization and patency of their infarct-related coronary after treatment of acute myocardial infarction with alteplase (rt-PA). *J Am Coll Cardiol* 1992;20:513-9.

[50] Kaplan K, Davison R, Parker M, Mayberry B, Feiereisel P, Salinger M. Role of heparin after intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1987;59:241-4.

[51] Raschke RA, Gollihare B, Pierce JC. The effectiveness of implementing the weight-based heparin normogram as a practice guideline. *Arch Intern Med* 1996;156:1645-9.

[52] Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, Cunningham MT, Giles A, Koepke JA, Witte DL. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of Anticoagulant Therapy. Laboratory Monitoring of Unfractionated Heparin Therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:782-98.

- [53] Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1094-6.
- [54] Thomas DP, Merton RE, Gray E, Barrowcliffe TW. The relative antithrombotic effectiveness of heparin, a low molecular weight heparin, and a pentasaccharide fragment in an animal model. *Thromb Haemost* 1989;61:204-7.
- [55] Ofosu FA, Blajchman MA, Modi GJ, Smith LM, Buchanan MR. The importance of thrombin inhibition for the expression of the anticoagulant activities of heparin, dermatan sulphate, low molecular weight heparin and pentosan polysulphate. *Br J Haematol* 1985;60:695-704.
- [56] Holmer E, Mattsson C, Nilsson S. Anticoagulant and antithrombotic effects of heparin and low molecular weight heparin fragments in rabbits. *Thromb Res* 1982;25:475-85.
- [57] Turpie AGG, Levine MN, Hirsh J, Carter CJ, Jay RM, Powers PJ, Andrew M, Hull RD, Gent M. A randomized controlled trial of a low molecular weight heparin (enoxaparin) to prevent deep-vein thrombosis in patients undergoing elective hip surgery. *N Engl J Med* 1986;315:925-9.
- [58] Prandoni P, Lensing AWA, Büller HR, Carta M, Cogo A, Vigo M, Casara D, Ruol A, Cate JWT. Comparison of subcutaneous low molecular weight heparin with intravenous standard heparin in proximal deep vein thrombosis. *Lancet* 1992;339:441-5.
- [59] Weitz JI. Low molecular weight heparins. *N Engl J Med* 1997;337:688-98.

- [60] Laposata M, Green D, Van Cott EM, Barrowcliffe TW, Goodnight SH, Sosolik RC. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of Anticoagulant Therapy. The clinical use and laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin, danaparoid, hirudin and related compounds, and argatroban. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:799-807.
- [61] Carter CJ, Kelton JG, Hirsh J, Cerskus A, Santos AV, Gent M. The relationship between the hemorrhagic and antithrombotic properties of low molecular weight heparin in rabbits. *Blood* 1982;59:1239-45.
- [62] Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt D. Biochemical and pharmacologic inequivalence of low molecular weight heparins. *Ann NY Acad Sci* 1989;556:333-53.
- [63] Samama MM, Bara L, Gouin-Thibault. New data on the pharmacology of heparin and low molecular weight heparins. *Drugs* 1996;52 (suppl 7):8-15.
- [64] Horlocker TT, Heit JA. Low molecular weight heparin: biochemistry, pharmacology, perioperative prophylaxis regimens, and guidelines for regional anesthetic management. *Anesth Analg* 1997;85:874-85.
- [65] Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. *Blood* 1992;79:1-17.
- [66] Huang JN, Shimamura A. Low molecular weight heparins. In: Neufeld EJ (ed) *Hematology/Oncology Clinics of North America – Coagulation Disorders and Treatment Strategies*, volume 12, number 6. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 1251-81.
- [67] Holst J, Lindblad B, Bergqvist D, Garre K, Nielsen H, Hedner U, Ostergaard PB. Protamine neutralization of intravenous and subcutaneous

low-molecular-weight heparin (tinzaparin, Logiparin<sup>TM</sup>). An experimental investigation in healthy volunteers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:795-803.

[68] Andrassy K, Eschenfelder V. Are the pharmacokinetic parameters of low molecular weight heparins predictive of their clinical efficacy? *Thromb Res* 1996;81:29-38.

[69] Altman R, Scazziota A, Rouvier J. Efficacy of unfractionated heparin, low molecular weight heparin, and both, combined for releasing total and free tissue factor pathway inhibitor. *Haemostasis* 1998;28:229-35.

[70] Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F. Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2251-62.

[71] Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995;74:90-3.

[72] Bara L, Bloch MF, Zitoun D, Samama M, Collignon AF, Uzan A, Bouthier J. Comparative effects of enoxaparin and unfractionated heparin in healthy volunteers on protrombin consumption in whole blood during coagulation and release of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 1993;69:443-52.

[73] Lane DA. Heparin binding and neutralizing proteins. In: Lane DA, Lindahl U (ed) *Heparin: chemical and biological properties, clinical applications*. 1<sup>o</sup> ed. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 363-91.

[74] Béguin S, Mardiguian J, Lindhout T, Hemker HC. The mode of action of low molecular weight heparin preparation (PK10169) and two of its major

components on thrombin generation in plasma. *Thromb Haemost* 1989;61:30-4.

[75] Palareti G, Legnani C, Bianchini B, Guazzaloca G, Maccaferri M, Marabini A, De Iaco P, Marcozzi S, Mancini L, Orlandi C, Coccheri S. Pharmacodynamic effects on blood coagulation of a new molecular weight heparin (Alfa-LMWH) in healthy volunteers and gynaecological surgery patients. *Int Angiol* 1989;8:47-52.

[76] Young E, Wells P, Holoway S, Weitz J, Hirsh J. Ex vivo and in vitro evidence that low molecular weight heparin exhibits less binding to plasma proteins than unfractionated heparin. *Thromb Haemost* 1994;71:300-4.

[77] Hemker HC, Béguin S, Pieters J, Lindhout T. The *ex vivo* correlate of the antithrombotic action of heparin. *Ann NY Acad Sci* 1989;556:146-57.

[78] Sobel M, McNeill PM, Carlson PL, Kermode JC, Adelman B, Conroy R, Marques D. Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 1991;87:1787-93.

[79] Romeuf C, Marzurier C. Heparin binding assay of von Willebrand factor vWF in plasma milieu – evidence of the importance of the multimerization degree of vWF. *Thromb Haemost* 1993;69:436-40.

[80] Barzu T, Van Rijn JLML, Petitou M, Tobelem G, Caen JP. Heparin degradation in the endothelial cells. *Thromb Res* 1987;47:601-9.

[81] Young E, Venner T, Ribau J, Shaughnessy S, Hirsh J, Podor TJ. The binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin to thrombin-activated human endothelial cells. *Thromb Res* 1999;96:373-81.

- [82] Barzu T, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J. Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture. *Biochem Biophys Acta* 1985;845:196-203.
- [83] Ljungberg B, Beving H, Egberg N, Johnsson H, Versterqvist O. Immediate effects of heparin and LMW heparin on some platelet and endothelial derived factors. *Thromb Res* 1988;51:209-17.
- [84] Xiao Z, Thérroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 1998;97:251-6.
- [85] Salzman EW. Low molecular weight heparin. Is small beautiful? *N Engl J Med* 1986;315:957-9.
- [86] Ageno W, Turpie AGG. New advances in the management of acute coronary syndromes: 4. Low-molecular-weight heparins. *CMAJ* 2002;166:919-24.
- [87] Cadroy Y, Pourrat J, Baladre MF, Saivin S, Houin G, Montastruc JL, Vernier I, Boneu B. Delayed elimination of enoxaparin in patients with chronic renal insufficiency. *Thromb Res* 1991;63:385-90.
- [88] Collignon F, Frydman A, Caplain H, Ozoux ML, Le Roux Y, Bouthier J, Thébault JJ. Comparison of the pharmacokinetic profiles of three low molecular mass heparins - dalteparin, enoxaparin and nadroparin - administered subcutaneously in healthy volunteers (doses for prevention of thromboembolism). *Thromb Haemost* 1995;73:630-40.
- [89] Antman EM, Louwerenburg HW, Baars HF, Wesdorp JCL, Hamer B, Bassand JP, Bigonzi F, Pisapia G, Gibson M, Heidbuchel H, Braunwald E,



Werf FV. Enoxaparin as adjunctive antithrombin therapy for ST-elevation myocardial infarction. Results of the ENTIRE-Thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 23 trial. *Circulation* 2002;105:1642-9.

[90] Findik S, Erkan MB, Albayrak S, Atici AG, Doru F. Low-molecular-weight heparin versus unfractionated heparin in the treatment of patients with acute pulmonary thromboembolism. *Respiration* 2002; 69:440-4.

[91] Simonneau G, Sors H, Charbonnier B, Page Y, Laaban JP, Azarian R, Laurent M, Hirsch JL, Ferrari E, Bosson JL, Mottier D, Beau B. A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1997;337:663-9.

[92] Monreal M, Lafoz E, Olive A, del Rio L, Vedia C. Comparison of subcutaneous unfractionated heparin with low molecular weight heparin (Fragmin®) in patients with venous thromboembolism and contraindications to coumarin. *Thromb Haemost* 1994;71:7-11.

[93] Juergens CP, Semsarian C, Keech AC, Beller EB, Harris PJ. Hemorrhagic complications of intravenous heparin use. *Am J Cardiol* 1997;80:150-4.

[94] Siragusa S., Cosmi B., Piovella F., Hirsh J., Ginsberg J.S. Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-analysis. *Am J Med* 1996;100:269-77.

[95] Cruz WO. The significance of a smooth muscle component in hemostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965;119:876-83.

[96] Heiden D, Mielke CH, Rodvien R. Impairment by heparin of primary

hemostasis and platelet (14C)5-hydroxytryptamine release. *Br J Haematol* 1977;36:427-36.

[97] Rao AK, Carvalho ACA. Acquired Qualitative platelet defects. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed) *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p. 685-704.

[98] Fernandez F, N'guyen P, Van Ryn J, Ofosu FA, Hirsh J, Buchanan MR. Hemorrhagic doses of heparin and other glycosaminoglycans induce a platelet defect. *Thromb Res* 1986;43:491-5.

[99] Cruz WO, Dietrich CP. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;126:420-6.

[100] Nader HB, Dietrich CP. Effect of heparin sulfate fractions on hemostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:504-8.

[101] Garcia HV, Jr., Buffolo E, Nader HB, Dietrich CP. ATP reduces blood loss produced by heparin in cardiopulmonary bypass operations. *Ann Thorac Surg* 1994;57:956-9.

[102] Merli G, Spiro TE, Olsson CG, Abildgaard U, Davidson BL, Eldor A, Elias D, Grigg A, Musset D, Rodgers GM, Trowbridge AA, Yusen RD, Zawilska K. Subcutaneous enoxaparin once or twice daily compared with intravenous unfractionated heparin for treatment of venous thromboembolic disease. *Ann Int Med* 2001;134:191-202.

[103] Grateau G, Chauvenet L, Oudard S, Bachmeyer C, Capron L, Horellou MH, Samama MM. Severe hemorrhagic complications during treatment with low molecular weight heparin. Apropos of 2 cases. *Rev Med Interne* 1997;

18:411-5.

[104] Dabney A, Bastani B. Enoxaparin-associated severe retroperitoneal bleeding and abdominal compartment syndrome: a report of two cases. *Intensive Care Med* 2001;27:1954-7.

[105] Maistre E, Allart C, Lecompte T, Bollaert PE. Severe bleeding associated with use of low molecular weight heparin and selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Med* 2002;113:530-2.

[106] Warkentin TE, Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia. *Prog Hemost Thromb* 1991;10:1-34.

[107] Lindhoff-Last E, Nakov R, Misselwitz F, Breddin HK, Bauersachs R. Incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients with deep vein thrombosis treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *Br J Haematol* 2002;118:1137-42.

[108] Kelton JG, Smith JW, Warkentin TE, Hayward CPM, Denomme GA, Horsewood P. Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood* 1994;83:3232-9.

[109] Chong BW, Fawaz I, Chesterman CN, Berndt MC. Heparin-induces thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haematol* 1989;73:235-40.

[110] Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 1995;332:1330-5.

- [111] Squires JW, Pinch LW. Heparin induces spinal fractures. JAMA 1979;241:2417-8.
- [112] Monreal M, Olive A, Lafoz E, del Rio L. Heparins, coumarin, and bone density. Lancet 1991;338:706.
- [113] Barbour LA, Kick SD, Steiner JF. A prospective study of heparin-induced osteoporosis in pregnancy using bone densitometry. Am J Obstet Gynecol 1994;170:862-9.
- [114] Dahlman TC. Osteoporotic fractures and the recurrence of thromboembolism during pregnancy and the puerperium in 184 women undergoing thromboprophylaxis with heparin. Am J Obstet Gynecol 1993;168:1265-70.
- [115] Muir J, Andrew M, Hirsh J. Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. Blood 1996; 88:1314-20.
- [116] Weitz JI, Hirsh J. New anticoagulant drugs. Chest 2001;119:95-107.

## *Capítulo II*

---

**ASSOCIAÇÃO DE DOSES BAIXAS DE HEPARINA  
NÃO FRACIONADA E DE HEPARINA DE BAIXO  
PESO MOLECULAR NA PREVENÇÃO DE  
TROMBOSE VENOSA EXPERIMENTAL**

**ABREVIATURAS**

- ADP – Adenosina difosfato
- AT – Antitrombina
- ATP – Adenosina trifosfato
- F – fator
- g – grama
- HBPM – heparina de baixo peso molecular
- HNF – heparina não fracionada
- kDa – quilodálton
- ml – mililitro
- rpm – rotação por minuto
- TFPI – Inibidor da via do fator tecidual
- TS – Tempo de sangramento
- TSf – Tempo de sangramento final
- TSi – Tempo de sangramento inicial
- TT – Tempo de trombina
- TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada
- TVP – trombose venosa profunda
- UI – Unidade internacional

**RESUMO**

Potencialização da atividade anti-Xa e da liberação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI) pelas células endoteliais produzida pela associação de doses baixas de heparina de baixo peso molecular (HBPM) e de heparina não fracionada (HNF) tem sido observada. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se essa associação é ao menos tão eficaz, na prevenção de trombose venosa experimental, quanto doses maiores, eficazes de HNF ou HBPM, utilizadas separadamente. Para tal, 71 ratos foram aleatoriamente distribuídos em 7 grupos: grupo controle (C), tratado com água destilada; H<sub>350</sub> com HNF 350 UI/kg; E<sub>2</sub> com enoxaparina 2 mg/kg; H<sub>175</sub> com HNF 175 UI/kg; E<sub>1</sub> com enoxaparina 1 mg/kg; H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> com HNF 175 UI/kg e enoxaparina 1 mg/kg e H<sub>100</sub>+ E<sub>0,5</sub> com HNF 100 UI/kg com enoxaparina 0,5 mg/kg. Quarenta minutos após a injeção subcutânea das drogas, a trombose foi induzida pela ligadura da veia cava posterior e de suas tributárias. Três horas após, os animais foram reanestesiados e as veias foram retiradas e abertas para verificar a presença do trombo. Quando presente, o trombo foi retirado e pesado, fresco e após secagem. Tempo de sangramento (TS) foi medido no início e no final do experimento. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de trombina (TT) foram determinados no final do experimento, em sangue colhido por punção cardíaca e os animais foram submetidos à eutanásia por super dosagem de anestésico. Outros 48 animais foram tratados da mesma maneira, sem a indução da trombose venosa, e os testes foram realizados quarenta minutos após a injeção das drogas. Houve desenvolvimento do trombo em 90,9%



dos animais do grupo C, em 20% no H<sub>350</sub>, em 22,2% no E<sub>2</sub>, em 10% no H<sub>175</sub>+E<sub>1</sub> e em 30% no H<sub>175</sub>+E<sub>0,5</sub>, havendo diferença estatisticamente significativa entre esses grupos e o controle, quanto à frequência e ao peso dos trombos. Nos grupos H<sub>175</sub> e E<sub>1</sub> o trombo desenvolveu-se em 70% dos animais. Apenas nos animais dos grupos H<sub>350</sub> e H<sub>175</sub>+E<sub>1</sub>, o TT e o TTPA estavam prolongados em relação ao grupo controle, no final do experimento. Quarenta minutos após a injeção das drogas, o TT estava prolongado nos grupos H<sub>350</sub> e H<sub>175</sub>+E<sub>1</sub>. Em conclusão, a combinação de doses mais baixas de HNF e HBPM foi tão efetiva para a prevenção do desenvolvimento de trombos na veia cava de ratos, quanto doses eficazes de cada uma das drogas utilizadas separadamente. Outros estudos experimentais e clínicos devem ser realizados para confirmar a eficácia e a segurança dessa associação, o que poderá permitir seu uso na prática clínica e diminuir os custos do tratamento.

### **PALAVRAS CHAVES**

- heparina, heparina de baixo peso molecular, trombose experimental, trombose venosa.

**ABSTRACT**

Potentialiation of the anti-Xa effect and of the release by endothelial cells of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) of low molecular weight heparin (LMWH) by low doses of unfractionated heparin (UH) have been observed. With the aim at verifying if this association is at least as effective as high doses of UH or LMWH, separated, in preventing experimental venous thrombosis, 71 rats, after anesthesia with sodium pentobarbital, were randomly allocated into 7 groups of treatment: control group (C) treated with distilled water; H<sub>350</sub> with heparin 350 UI/kg; E<sub>2</sub> with enoxaparin 2 mg/kg; H<sub>175</sub> with heparin 175 UI/kg; E<sub>1</sub> with enoxaparin 1mg/kg; H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> with heparin 175 UI/kg plus enoxaparin 1mg/kg and H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> with heparin 100 UI/kg plus enoxaparin 0,5 mg/kg. Forty minutes after sub-cutaneous injection of the drugs, venous thrombosis was induced by ligation of the caudal vena cava and its branches. Three hours latter, the animals were re-anesthetized and the vein was dissected free and opened to verify the presence of thrombus. If present the thrombus was withdraw and weighted, fresh and after drying. Bleeding time (BT), was measured at the beginning and at the end of the experiment. Activated partial thromboplastin time (APTT) and thrombin time (TT) were measured at the end of the experiment in blood taken by cardiac puncture and the animals were submitted to euthanasia by an over dose of anesthetics. In another 48 animals treated the same way, without thrombus induction, these tests were performed forty minutes after injection of drugs. Thrombus developed in 90.9% of the animals of the group C, in 20% in H<sub>350</sub>, in 22,2% in E<sub>2</sub>, in 10% in H<sub>175</sub>+E<sub>1</sub> and in 30% in

H<sub>175</sub>+E<sub>0,5</sub>, being the frequency and the weight of the thrombus statistically different between these groups and the control group. In H<sub>175</sub> and E<sub>1</sub> thrombi developed in 70% of animals. Only in the animals of the H<sub>350</sub> and of H<sub>175</sub>+E<sub>1</sub>, TT and APTT were prolonged in relation to C group in the end of the experiment. Forty minutes after drugs injection, TT was prolonged only in the groups H<sub>350</sub> and H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub>. In conclusion combination of low doses of unfractionated heparin and low molecular weight heparin were so effective as high doses of each one of these substances used alone, for the prevention of thrombus development in the vena cava of rats. Further experimental and clinical studies must be performed to confirm the efficacy and safety of this combination scheme, allowing its use in clinical practice and possibly lowering the costs of treatment.

### **KEY WORDS**

- Heparin, low molecular weight heparin, venous thrombosis, experimental thrombosis.

### **INTRODUÇÃO**

A droga padrão utilizada para a prevenção e tratamento de eventos tromboembólicos é a heparina. Essa substância foi descoberta, em 1916, por McLean [1] e vem sendo utilizada desde meados do século 20 [2].

A heparina não fracionada (HNF) é uma substância heterogênea em relação ao seu peso molecular, estrutura, atividade anticoagulante e afinidade cromatográfica. Ela é um glicosaminoglicano composto por moléculas de diferentes pesos, variando entre 2 e 40 kDa (média de 15 a 18 kDa) [3, 4]. Uma seqüência pentassacarídica específica é o elemento estrutural crucial para a ligação de alta afinidade da heparina com a antitrombina (AT) [5, 6, 7], formando um complexo, que promove uma mudança conformacional no centro reativo da AT, aumentando a velocidade da sua ação inibidora [8]. O complexo AT/heparina inativa um grande número de enzimas da coagulação, incluindo FIIa (trombina), FXa, FXIIa, FXIa, FIXa, dentre os quais, a trombina e o FXa são os mais responsivos à inibição [9]. Moléculas de heparina que contêm menos de 18 sacarídeos não se ligam simultaneamente à trombina e AT e são incapazes de catalisar a inibição da trombina. Em contraste, fragmentos pequenos de heparina, que contêm a seqüência pentassacarídica de alta afinidade, catalisam a inibição do fator Xa pela AT [10, 11, 12].

A heparina apresenta limitações farmacocinéticas e biofísicas. As primeiras são relacionadas às suas ligações com proteínas plasmáticas, células endoteliais e leucócitos, resultando em um complexo mecanismo de depuração, na variabilidade da resposta anticoagulante, bem como na

resistência à heparina. As limitações biofísicas ocorrem porque o complexo AT/heparina é incapaz de inativar o FXa do complexo protrombinase e a trombina ligada à fibrina ou às superfícies celulares [9].

As heparinas de baixo peso molecular (HBPM) são fragmentos da HNF, [13]; são heterogêneas em tamanho, variando seu peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa, com média entre 4 e 5 kDa. Como apenas 25 a 50% das moléculas contêm 18 sacarídeos necessários para a inibição da trombina, a relação entre as atividades anti-Xa e anti-IIa das HBPM pode variar de 1,9:1,0 a 4,0:1,0 [14] .

As HBPM produzem uma resposta antitrombótica com melhor relação dose-efeito, refletindo sua maior biodisponibilidade, maior meia-vida e depuração dose-independente. Sua diferença farmacocinética, em relação à HNF, pode ser explicada pela menor afinidade às proteínas plasmáticas, células endoteliais e macrófagos. As possíveis menores incidência e magnitude de sangramento se devem à pouca inibição da função plaquetária, ao fato de não causarem aumento da permeabilidade microvascular, à sua baixa afinidade com as células endoteliais e ao fator de von Willebrand [13]. Como ocorre com a HNF, as HBPM também induzem liberação, pelas células endoteliais, do inibidor da via do fator tecidual (TFPI), o que aumenta a inibição do FXa [15, 16, 17].

Desta maneira, as HBPM são, pelo menos, tão eficazes e seguras quanto a HNF para a prevenção e tratamento dos eventos tromboembólicos. Além disso, são de fácil administração e não necessitam de monitorização laboratorial, na maioria dos casos [3, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21]. O fator

limitante para sua utilização em larga escala, no tratamento e profilaxia de doença tromboembólica, principalmente nos países em desenvolvimento, é seu alto custo.

Perez-Requejo *et al* [22], em 1997, relataram efeito sinérgico, *ex vivo*, na associação de baixas doses de HNF e de HBPM, observando que a atividade anti-Xa gerada após a injeção subcutânea de 1.000 UI de HNF, associada a 20 mg de enoxaparina, era maior do que seria a esperada pela adição dos efeitos anti-Xa gerados pela administração de cada uma destas drogas separadamente.

Altman *et al* [23], em 1999, demonstraram que, quando se administram doses baixas de HNF e de HBPM, ocorre sinergismo na liberação do TFPI livre pelas células endoteliais e que o aumento do TFPI livre no plasma mantém-se por tempo mais prolongado do que quando as heparinas são utilizadas isoladamente.

Considerando esses dados, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar o efeito da associação de HBPM e HNF em doses menores do que as doses eficazes, quando administradas isoladamente, para impedir a formação de trombo induzido, experimentalmente, em veia cava posterior de rato.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Animais**

Cento e dezenove ratos da raça Wistar, machos, com peso entre 230 a 530 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Botucatu, foram utilizados de acordo com a Lei

Federal número 6638 de 08/05/1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, e o acesso à comida foi restringido nas 12 horas que antecederam o experimento.

### **Drogas**

- HNF - Liquemine® - Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA, São Paulo, Brasil.
- HBPM - Clexane® - Rhodia Pharma, São Paulo, Brasil.

### **Reagentes**

- Reagentes para TT – Dade® Thrombin Reagent - Dade Behring – Marburg, Germany.
- Reagentes para TTPA - Platelin® LS – Organon Teknika Corporation – Box 15969 Durham, North Carolina, USA.

### **Grupos experimentais**

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/kg) e foram sorteados para um dos seguintes grupos experimentais:

- Grupo C: grupo controle, 11 animais tratados com água destilada, na dose de 0,1 ml/kg;
- Grupo H<sub>350</sub>: 10 animais tratados com heparina, na dose de 350 UI/kg de peso;

- Grupo E<sub>2</sub>: 9 animais tratados com enoxaparina, na dose de 2,0 mg/kg de peso;
- Grupo H<sub>175</sub>: 10 animais tratados com heparina, na dose de 175 UI/kg de peso;
- Grupo E<sub>1</sub>: 10 animais tratados com enoxaparina, na dose de 1,0 mg/kg de peso;
- Grupo H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub>: 10 animais tratados com heparina, na dose de 175 UI/kg de peso, e enoxaparina, na dose de 1,0 mg/kg de peso;
- Grupo H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub>: 10 animais tratados com heparina, na dose de 100 UI/kg de peso, e enoxaparina, na dose de 0,5 mg/kg de peso.

As drogas foram diluídas em água destilada e esterilizada, de maneira que os animais, em todos os grupos, recebessem um volume de 0,1 ml/kg de peso, por via subcutânea.

As doses utilizadas nos grupos H<sub>350</sub> e E<sub>2</sub> foram determinadas em experimento piloto, como sendo as doses mínimas eficazes na prevenção da formação de trombos, nesse modelo.

Os animais foram medicados por outro membro da equipe, sem que a pesquisadora tivesse prévio conhecimento da medicação utilizada em cada animal.

### **Indução da trombose venosa**

Quarenta minutos após a medicação, o abdome dos animais foi aberto cirurgicamente para a indução da trombose venosa, segundo o modelo de Reyers modificado [24, 25]: a veia cava inferior foi delicadamente isolada e



foram ligadas todas as tributárias presentes até os 2 cm distais à confluência da veia renal esquerda. A veia cava foi, então, ligada com fio de algodão, em local imediatamente caudal à veia renal esquerda. Após a ligadura, o abdome foi fechado com pontos totais de fio de algodão.

Três horas após a indução da trombose, os animais foram reanestesiados e o abdome foi reaberto para verificação da presença de trombo. A veia cava inferior foi retirada e aberta em sentido longitudinal. Quando presente, o trombo foi retirado e pesado, imediatamente e após permanecer por 24 horas em estufa a 37 °C (peso seco).

### **Tempo de sangramento (TS)**

O TS foi medido antes da medicação e no momento da avaliação da trombose. Para tal, foi realizada uma incisão longitudinal de 3 mm de comprimento por 2 mm de profundidade, na face ventral da cauda do animal, entre 8 e 9 cm do final desta, evitando-se grandes veias. A cauda foi mergulhada em uma proveta com soro fisiológico a 37 °C. O tempo de sangramento foi mensurado desde o momento da incisão até o final do sangramento [26, 27, 28, 29, 30].

### **Determinação do tempo de trombina (TT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)**

Após a retirada da veia cava, foram coletados 3 ml de sangue, por punção cardíaca, que foram colocados em tubo contendo citrato de sódio a 3,8%, na proporção de 9:1, imediatamente centrifugados a 2.500 rpm, durante 15 minutos, para a separação do plasma e determinação do TT e TTPA.

Imediatamente após, os animais foram submetidos à eutanásia com superdosagem de anestésico.

### **TS, TT e TTPA no momento correspondente à indução da trombose**

Outros 48 animais, com as mesmas características citadas, foram anestesiados e sorteados para grupos com os mesmos regimes de medicação descritos anteriormente: C', H'<sub>350</sub>, E'<sub>2</sub>, H'<sub>175</sub>, E'<sub>1</sub>, H'<sub>175</sub> + E<sub>1</sub>, H'<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub>.

Os animais foram medicados sem que a pesquisadora tivesse conhecimento prévio da droga e dose utilizadas. Quarenta minutos após a medicação, foi determinado o TS e feita coleta de sangue por punção cardíaca, para determinação do TT e TTPA. Imediatamente após, os animais foram submetidos à eutanásia.

### **Análise estatística**

Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foi utilizada análise de variância. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variância foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste de Wilcoxon foi utilizado para a variável TS a fim de ser feita a comparação entre os momentos inicial e final. Para comparação das proporções dos animais, em relação à presença de trombo, foi utilizado o teste de Goodman [31, 32].

O nível de significância utilizado foi de 5%.

### RESULTADOS

#### Peso dos Animais

Não houve diferença estatisticamente significativa no peso dos animais, entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

#### Presença de Trombo

No grupo controle (C), 10 dos 11 animais apresentaram trombo (90,9%). Os animais tratados com heparina na dose de 350 UI/kg ( $H_{350}$ ), com enoxaparina na dose de 2 mg/kg ( $E_2$ ) e com as duas associações de heparina com enoxaparina ( $H_{175} + E_1$  e  $H_{100} + E_{0,5}$ ) apresentaram número de trombos estatisticamente menor do que os animais do grupo controle. Não houve diferença estatística entre o número de animais com trombo nos grupos tratados com doses menores de heparina ou enoxaparina, em relação aos demais grupos (figura 1 e tabela 1).

#### Peso dos trombos

As medianas dos pesos dos trombos frescos, nos diferentes grupos experimentais, são apresentadas na tabela 1 e figura 2. Houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos pesos dos trombos, nos animais dos grupos C e dos grupos  $H_{350}$ ,  $E_2$ ,  $H_{175} + E_1$  e  $H_{100} + E_{0,5}$  ( $p < 0,05$ ), os quais não diferiram entre si. Os grupos  $H_{175}$  e  $E_1$  não diferiram dos demais grupos.

Os resultados da análise estatística, referentes aos pesos dos trombos secos, não diferiram dos resultados da análise dos pesos dos trombos frescos.

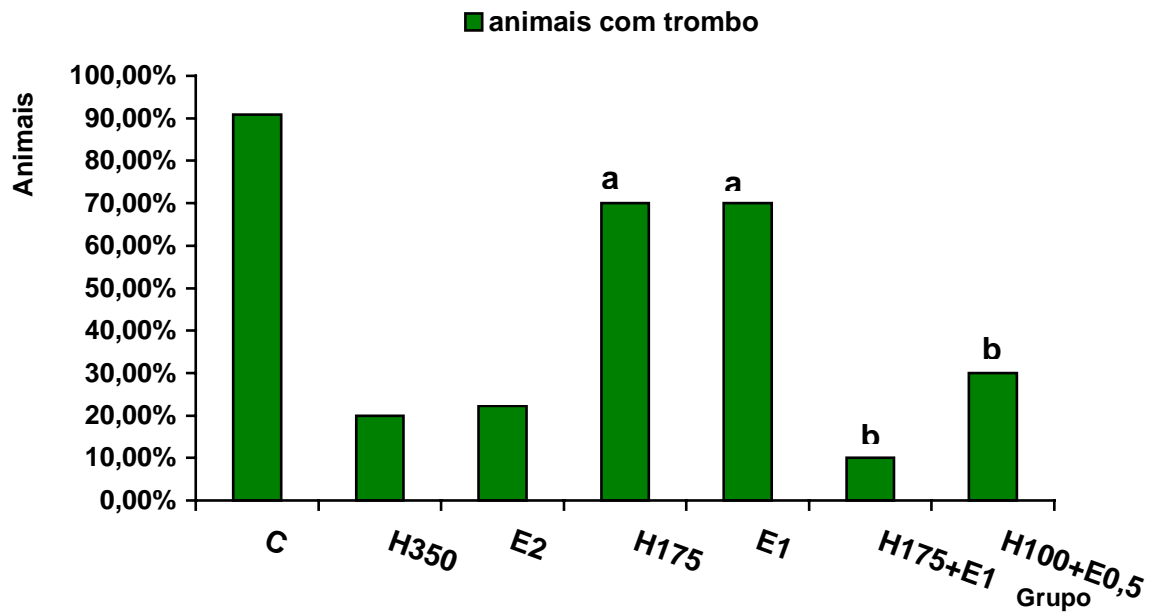


Figura 1: Distribuição de freqüências de animais com trombo, nos grupos estudados. C = controle, H<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Grupos representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

Tabela 1 - Frequência de animais com trombo e mediana dos pesos dos trombos frescos nos diferentes grupos experimentais

Grupo	N	Animais com trombo		Mediana dos pesos dos trombos frescos (g)
		Nº	%	
C	11	10	90,9 <sup>a</sup>	0,03010 <sup>a</sup>
H <sub>350</sub>	10	2	20,0 <sup>b</sup>	0,00000 <sup>b</sup>
E <sub>2</sub>	9	2	22,2 <sup>b</sup>	0,00000 <sup>b</sup>
H <sub>175</sub>	10	7	70,0 <sup>ab</sup>	0,00285 <sup>ab</sup>
E <sub>1</sub>	10	7	70,0 <sup>ab</sup>	0,00100 <sup>ab</sup>
H <sub>175</sub> + E <sub>1</sub>	10	1	10,0 <sup>b</sup>	0,00000 <sup>b</sup>
H <sub>100</sub> + E <sub>0,5</sub>	10	3	30,0 <sup>b</sup>	0,00000 <sup>b</sup>

C = controle, H<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Em cada coluna, valores seguidos pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

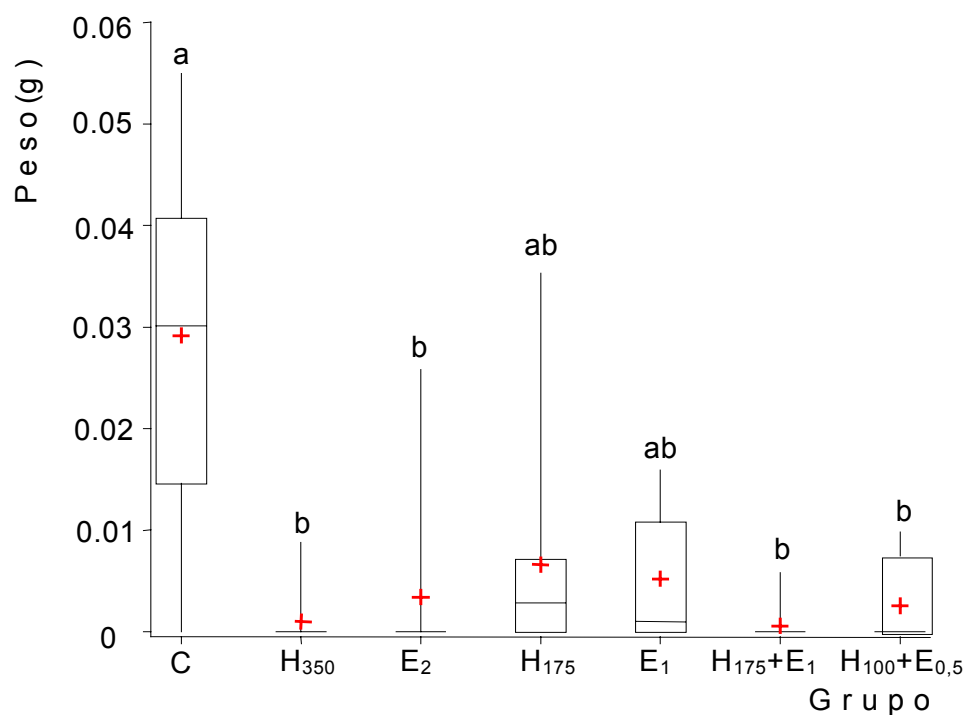


Figura 2 – Mediana (—), média (+), quartis e valores máximos e mínimos dos pesos dos trombos frescos, nos grupos de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento. C = controle, H<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Grupos representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

### Tempo de sangramento

Os tempos de sangramentos, inicial (TSi) e final (TSf), são apresentados na figura 3. Houve variação estatisticamente significativa apenas entre o TSi e o TSf, nos grupos tratados com heparina 350 UI/kg e 175 UI/kg. Houve também aumento nos grupos  $H_{175} + E_1$  e  $E_1$  que, entretanto, não foi significativo.

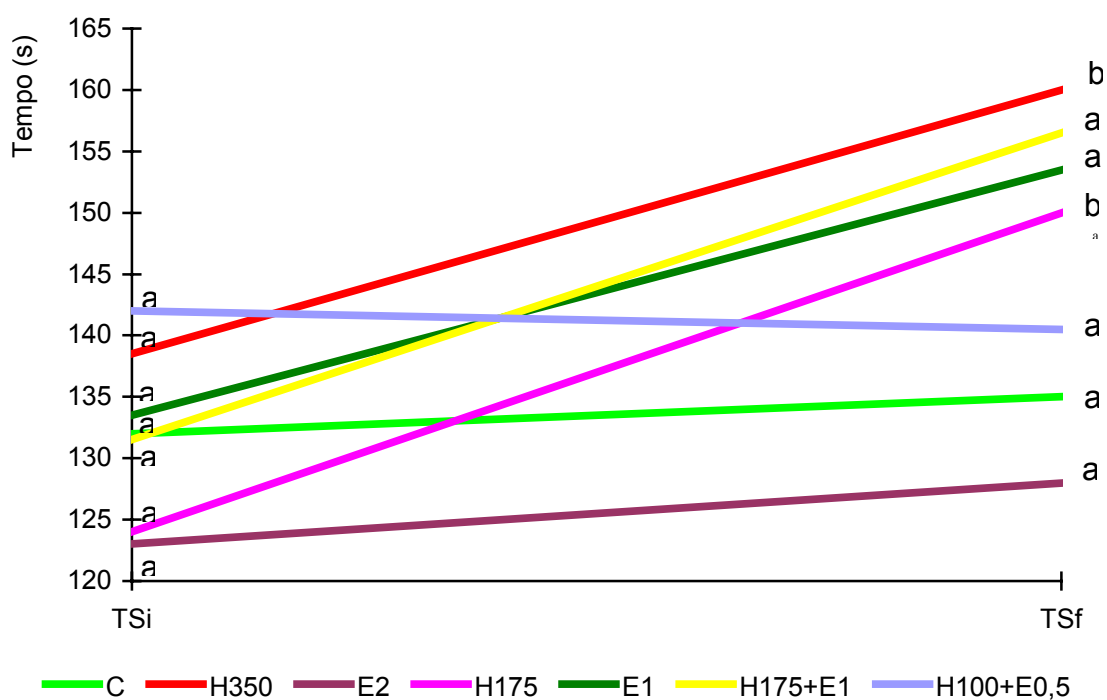


Figura 3 - Tempo de sangramento inicial (TSi) e final (TSf) nos grupos de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento. C = controle,  $H_{350}$  = heparina 350 UI/kg (TSf > TSi,  $p < 0,05$ ),  $E_2$  = enoxaparina 2,0 mg/kg,  $H_{175}$  = heparina 175 UI/kg (TSf > TSi,  $p < 0,05$ ),  $E_1$  = enoxaparina 1,0 mg/kg,  $H_{175} + E_1$  = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg,  $H_{100} + E_{0,5}$  = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. TSi e TSf, em cada grupo, representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

Os valores de TS realizado 40 minutos após a medicação (TS40) são apresentados na figura 4. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a essa variável nos grupos analisados ( $p = 0,076$ ).

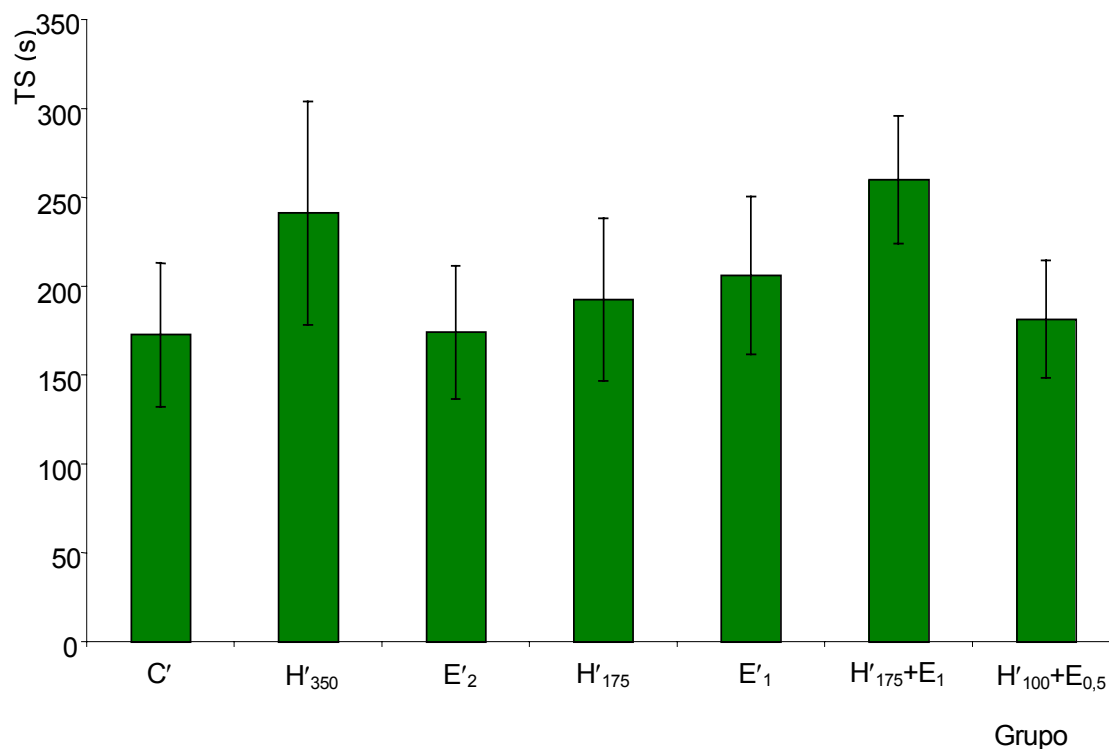


Figura 4 – Média e desvio-padrão do TS, 40 minutos após a medicação dos animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento. C' = controle, H'<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E'<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H'<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E'<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H'<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H'<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Tempo de trombina (TT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)**

Os resultados do TT e do TTPA, nos diversos grupos de animais em que foi induzida a trombose, são apresentados nas figuras 5 e 6, respectivamente. Nos grupos H<sub>350</sub> e H<sub>175</sub>+E<sub>1</sub>, esses tempos foram significativamente maiores do que os do grupo controle (p < 0,001).

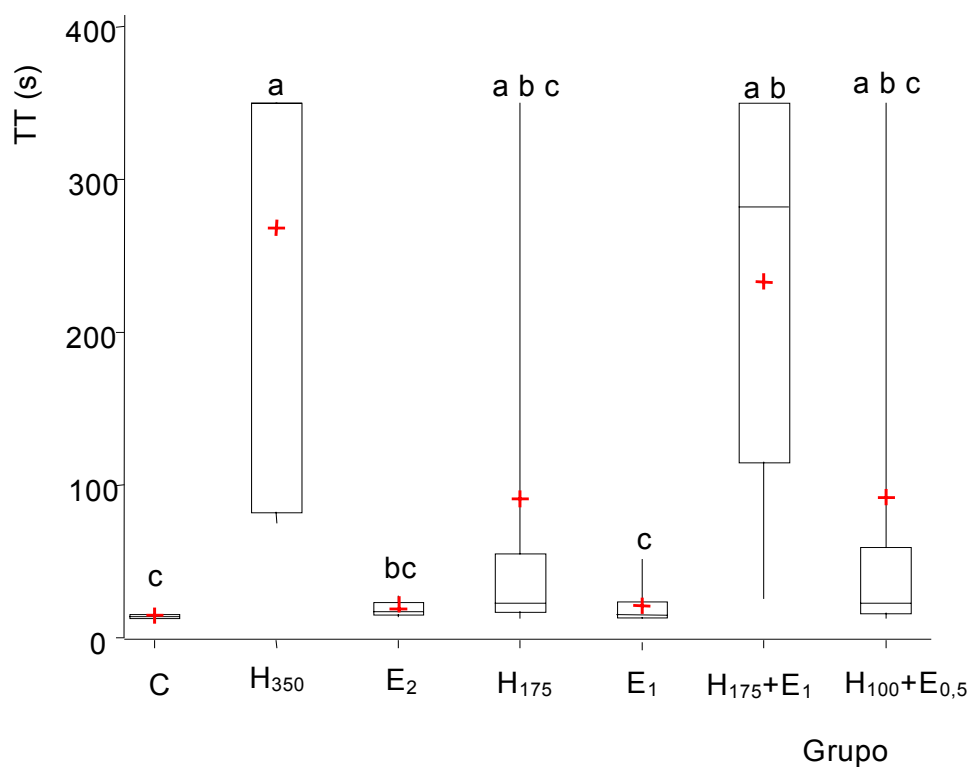


Figura 5 – Mediana (—), média (+), quartis e valores máximos e mínimos do TT, no término do experimento, nos grupos de animais em que foi induzida trombose. C = controle, H<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Grupos representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

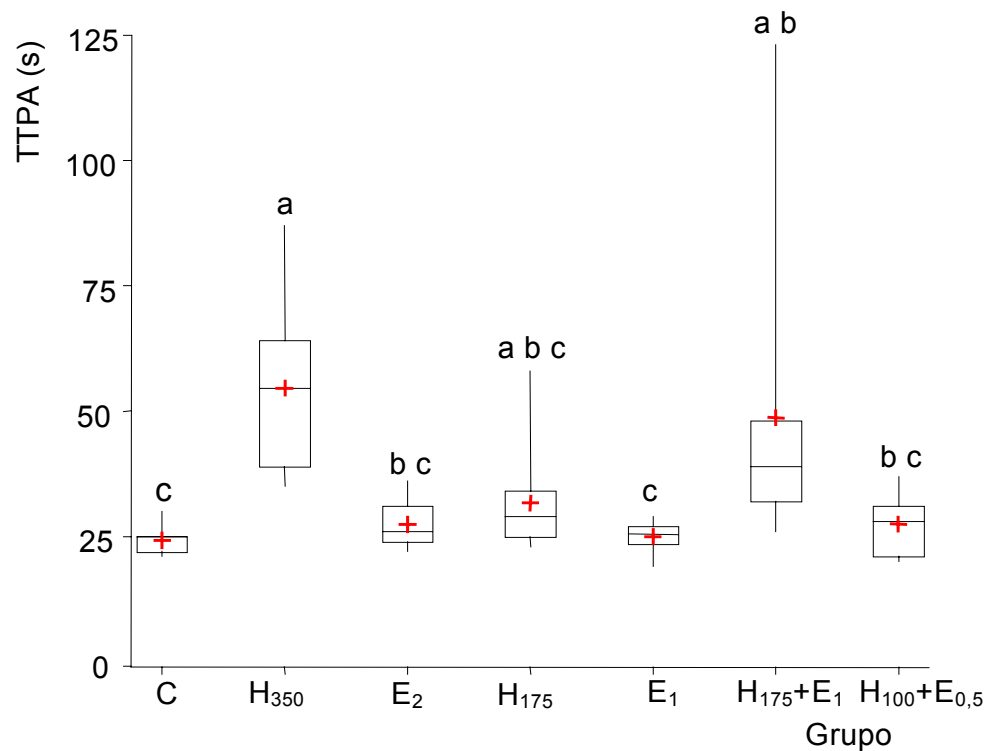


Figura 6 – Mediana (—) média (+), quartis e valores máximos e mínimos do TTPA, no término do experimento, nos grupos de animais em que foi induzida trombose. C = controle, H<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Grupos representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

Os valores do TT dos 48 animais utilizados apenas para avaliação da hemostasia são apresentados na figura 7. Nos grupos  $H_{350}$ ,  $H_{175}$ ,  $H_{175}+E_1$  e  $H_{100}+E_{0,5}$  o TT foi significativamente maior do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ). Nos dois grupos de animais tratados apenas com enoxaparina, o TT não diferiu do encontrado no grupo controle.

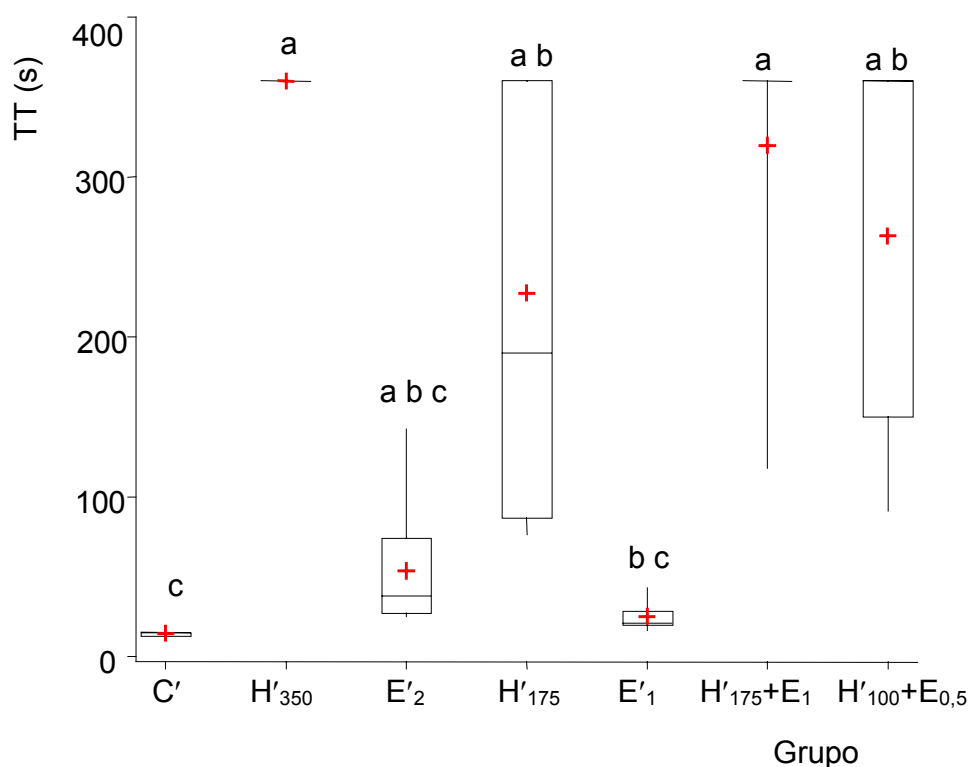


Figura 7 – Mediana (—), média (+), quartis e valores máximos e mínimos do TT, 40 minutos após a medicação, nos grupos de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento. C' = controle, H'350 = heparina 350 UI/kg, E'2 = enoxaparina 2,0 mg/kg, H'175 = heparina 175 UI/kg, E'1 = enoxaparina 1,0 mg/kg, H'175 + E1 = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H100 + E'0,5 = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Grupos representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente.

Os valores do TTPA desses animais são apresentados na figura 8. Quarenta minutos após a injeção das drogas em estudo, os animais dos grupos H<sub>350</sub> e H<sub>175</sub>+ E<sub>1</sub> apresentaram TTPA significativamente maior que o encontrado nos animais do grupo controle ( $p < 0,001$ ). O grupo H<sub>350</sub> diferiu estatisticamente dos dois grupos em que os animais foram tratados apenas com enoxaparina.

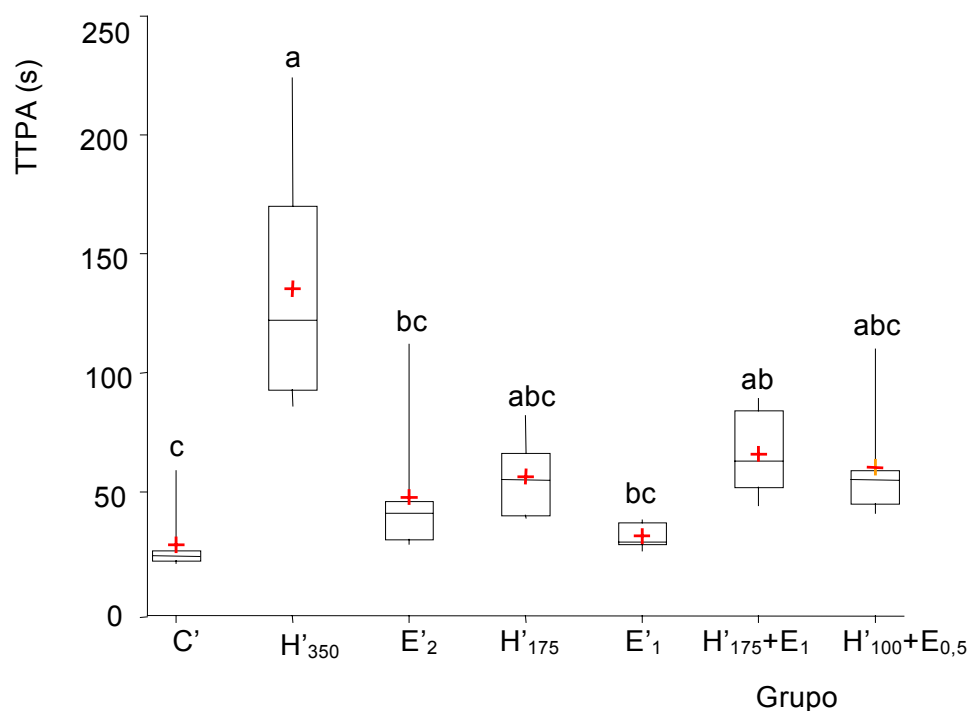


Figura 8 – Mediana (—), média (+), quartis e valores máximos e mínimos do TTPA, 40 minutos após a medicação, nos grupos de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento. C' = controle, H'<sub>350</sub> = heparina 350 UI/kg, E'<sub>2</sub> = enoxaparina 2,0 mg/kg, H'<sub>175</sub> = heparina 175 UI/kg, E'<sub>1</sub> = enoxaparina 1,0 mg/kg, H'<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> = heparina 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg, H'<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> = heparina 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/kg. Grupos representados pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente

Os dados referentes a cada animal dos diferentes grupos experimentais (peso do animal, presença ou ausência de trombo, pesos fresco e seco do trombo, TS, TT e TTPA) são apresentados no anexo.

### **DISCUSSÃO**

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que as associações de HNF e HBPM, em doses baixas, que, isoladamente, não impediram o desenvolvimento do trombo nesse modelo animal, possuem efeito antitrombótico pelo menos tão eficaz quanto o verificado com a utilização de doses maiores, que isoladamente impediram esse desenvolvimento. Esses resultados concordam com os achados de Perez-Requejo *et al* [22] e Altman *et al* [23], que mostraram potencialização do efeito anti-Xa e da liberação do TFPI, após injeção da associação de doses baixas de HNF e de HBPM.

Sinergismo no aumento da atividade anti-Xa, na vigência da associação, *in vitro*, de fragmentos de baixa afinidade à AT com as heparinas, foi evidenciado por Young *et al* [33]. Esses autores administraram HNF ou HBPM em voluntários saudáveis e em pacientes submetidos à profilaxia de TVP pós-operatória e, *in vitro*, adicionaram os fragmentos de baixa afinidade aos plasmas desses indivíduos. Amostras de plasmas de indivíduos tratados com HNF apresentaram níveis de atividade anti-Xa aumentados em 350% após a adição desses fragmentos, que teoricamente deslocariam a heparina com atividade anticoagulante das proteínas plasmáticas. Essa mesma adição, em plasmas de indivíduos

tratados com HBPM, provocou aumento de 25 a 35% da atividade anti-Xa. Verificaram, ainda, que esse aumento era maior em plasmas de pacientes do que em plasmas dos voluntários sadios, provavelmente, devido ao aumento das proteínas de reação de fase aguda [33]. Em nosso trabalho, é possível que a adição de moléculas de baixa afinidade à AT, contidas na HNF, tenham provocado aumento na atividade antitrombótica por esse mesmo mecanismo.

Perez-Requejo *et al* [22], além dessa mesma explicação para o fenômeno de potencialização do efeito anti-Xa que encontraram com essa associação, levantaram também a hipótese da importância da propriedade anti-IIa. Ofosu *et al* [34] estudaram HNF, derivados de baixo peso molecular da heparina e outros polissacarídeos sulfatados, como dermatan sulfato e pentosan polissulfato, comparando a atividade anti-Xa e a capacidade para inibir a geração de trombina. Seus resultados mostraram que apenas a HNF inibiu igualmente a trombina e o fator Xa e que os derivados de baixo peso molecular foram os inibidores mais fracos da geração de trombina. Esses autores sugeriram, assim, que a inativação da trombina pode ser crítica para a eficácia das heparinas e heparinóides, bem como de outros agentes antitrombóticos e que um certo grau de atividade inibidora da trombina parece ser necessária para um ótimo efeito antitrombótico.

Embora a heparina seja largamente utilizada como agente antitrombótico, seus mecanismos de ação não são totalmente conhecidos. Outros mecanismos, além dos associados com a AT, podem

estar relacionados com a ação antitrombótica observada com a associação de HNF com HBPM.

Um desses mecanismos poderia ser a liberação do TFPI, que é o maior inibidor fisiológico da via extrínseca da coagulação, ou via mediada pelo fator tissular [35]. Alguns estudos recentes têm sugerido que o TFPI pode exercer um papel significativo na antitrombose induzida pela heparina [15].

O TFPI é um inibidor de serino protease, que se liga ao fator Xa inibindo-o e, uma vez em complexo com o fator Xa, liga-se ao complexo fator tissular/fator VIIa e o inibe [36]. O TFPI é encontrado em vários compartimentos: 75% associado com superfícies celulares endoteliais, 20% ligado a lipoproteínas, 2,5% associado a plaquetas e 2,5% livre no plasma [37, 38, 39, 40]. Vários estudos demonstraram que ambas heparinas, HNF e HBPM, promoviam liberação de TFPI do compartimento relacionado com as células endoteliais [15, 41]. Brown *et al* [42] evidenciaram elevação menor e mais tardia dos níveis do TFPI após utilização de uma HBPM (dalteparina), em relação aos níveis liberados e ao pronto aumento que se segue à administração de HNF. Como já referido, Altman *et al* [23] demonstraram que a associação de enoxaparina e baixas doses de HNF exercem efeito sinérgico na liberação de TFPI pelas células endoteliais, *ex vivo*, podendo contribuir para o efeito antitrombótico dessa associação, por nós observado.

Nader *et al* [43] demonstram que a heparina aumentava, em cerca de 2 a 3 vezes, a síntese de heparan sulfato realizada pelas células endoteliais em meio de cultura e que esse aumento ocorria imediatamente após a

exposição das células endoteliais à heparina. Demonstraram, também, que ocorria aumento do grau de sulfatação nos resíduos de ácido urônico do heparan sulfato proveniente destas células. Esse mesmo efeito foi demonstrado por Pinhal *et al* [44], utilizando outros agentes antitrombóticos, entre eles algumas HBPM. Pinhal *et al* [45] demonstraram que um tetrassacarídeo pentassulfatado da heparina era o fragmento mínimo do composto capaz de exercer esses efeitos. No mesmo laboratório foi demonstrada a existência de uma molécula de 47 kDa presente nas células endoteliais, que se ligava com alta afinidade à heparina. Esta molécula, provavelmente, poderia ser o receptor ou um dos receptores celulares envolvidos com a sinalização de agentes antitrombóticos, para a produção endotelial de heparan sulfato, aumentando a proteção do vaso contra a formação do trombo [46]. Desta maneira, Pinhal *et al* [45] supõem que a atividade antitrombótica da heparina, *in vivo*, possa estar relacionada com aumento do heparan sulfato. Visto que tanto a HNF como a HBPM atuam aumentando a liberação de heparan sulfato pela célula endotelial, poder-se-ia levantar a hipótese de que a associação dessas duas heparinas levaria à liberação de maior quantidade de heparan sulfato, também contribuindo com o efeito antitrombótico encontrado neste trabalho.

Houve alteração estatisticamente significativa do TS, quando se compararam os momentos inicial e final, nos grupos de animais tratados com HNF, nas doses de 350 UI/kg e 175 UI/kg. Esses resultados concordantes com achados de estudos experimentais realizados em



diferentes espécies animais, como em rato [47, 48, 49, 50], cachorro [51], coelho [52]. Este prolongamento do TS pode ser explicado pela diminuição da agregação plaquetária, conseqüente à inibição da trombina pela heparina [53]. É referido também um efeito dose-resposta, sendo o prolongamento do TS diretamente proporcional à quantidade de fragmentos de heparina de alta afinidade pela AT [50]. Heiden *et al* [54], em experimento com voluntários sadios, observaram aumento significativo do tempo de sangramento após administração de HNF e diminuição significativa da liberação plaquetária de serotonina, *ex vivo*, em resposta ao colágeno, epinefrina e ADP, caracterizando, assim, uma alteração nas propriedades hemostáticas plaquetárias, independente do efeito da heparina sobre a coagulação do plasma.

Outra explicação para o prolongamento do TS pela heparina pode ser dada a partir dos trabalhos de Cruz [55], Cruz *et al* [56] e Nader *et al* [57], que observaram que heparina, como outros glicosaminoglicanos sulfatados, tinha um importante efeito anti-hemostático quando aplicada topicamente, em ferimento provocado na pele de ratos, promovendo aumento do sangramento de pequenos vasos e capilares. Nader *et al* [58] observaram que a atividade inibitória do processo hemostático, resultante da adição, a tecidos lesados de ratos, de moléculas de heparina ou simplesmente de dissacarídeos derivados do heparan sulfato, contendo um sulfato na posição C6, na metade glicosamina, poderia ser revertida pela adição de ATP, que deslocaria a heparina ligada ao receptor. Estudos experimentais, do mesmo grupo, demonstraram que a heparina inibia competitivamente a hidrólise do

ATP pela miosina ATPase [56]. Garcia *et al* [59] observaram diminuição da perda sangüínea produzida pela heparina em cirurgias cardiopulmonares com circulação extracorpórea, lavando-se a cavidade torácica com soluções contendo ATP. Esses autores interpretaram esses resultados, supondo que a heparina se ligava a uma molécula similar à miosina das células musculares lisas dos vasos, inibindo sua contratilidade e aumentando o sangramento.

Neste trabalho, diferentemente do que ocorreu com a HNF, não houve alteração estatisticamente significativa do TS nos animais tratados com enoxaparina, comparados com os animais do grupo controle, sugerindo que, com essa HBPM, esses mecanismos sejam menos importantes. Resultados similares foram encontrados com outras HBPM, tanto clínica como experimentalmente [26, 60, 61]. Monreal *et al* [62], entretanto, não encontraram diferenças significativas no TS quando compararam grupos de coelhos tratados com HNF (calciparina) e com dalteparina. Em humanos, vários autores encontraram aumento do TS, *in vivo* e *in vitro*, quando utilizaram HNF, e ausência desse efeito com as HBPM [63, 64, 65, 66, 67, 68]. As associações utilizadas de HNF e HBPM, neste trabalho, similarmente às HBPM, não alteraram o TS.

Como o TTPA e o TT são sensíveis aos efeitos inibitórios da heparina sobre a trombina, os resultados desses testes apresentaram-se prolongados no grupo H<sub>350</sub>. No grupo H<sub>175</sub> essas alterações não foram encontradas, podendo-se concluir que talvez essa dose, isoladamente, não seja suficiente para produzi-las. As alterações significativas desses testes, no grupo da

associação  $H_{175} + E_1$ , podem, de alguma maneira, refletir o provável sinergismo do efeito anticoagulante dessa associação. Esse sinergismo na resposta anticoagulante, entretanto, não ocorreu no grupo  $H_{100} + E_{0,5}$ , embora a associação dessas doses tenha promovido efeito antitrombótico. Em concordância com diversos estudos prévios, não foram evidenciadas alterações do TT e do TTPA nos grupos tratados exclusivamente com HBPM [13, 68, 69, 70, 71].

O objetivo de se avaliar os testes de coagulação aos 40 minutos foi o de saber o valor dos mesmos no momento da indução da trombose. Dos 48 animais estudados, os que foram medicados com HNF apresentaram alteração significativa do TT, o mesmo acontecendo com os que apresentaram trombo em frequência semelhante ao grupo controle, provavelmente devido à maior sensibilidade desse teste à presença de heparina, que, entretanto, não refletiu o efeito antitrombótico dos esquemas terapêuticos utilizados. O TTPA apresentou resultados similares ao do TTPA medido no final do experimento nos 71 animais, não refletindo a ação antitrombótica no grupo que recebeu a associação de doses menores das duas heparinas.

Em conclusão, no modelo experimental utilizado, as associações de HNF e HBPM, em doses menores do que as doses necessárias de cada droga isoladamente, para prevenção do desenvolvimento de trombo, foram tão eficazes quanto cada uma dessas drogas utilizadas isoladamente, em doses maiores.

Novos estudos, tanto experimentais como em seres humanos, são

necessários para que a ação antitrombótica e a segurança dessa associação sejam confirmadas, viabilizando sua utilização clínica e permitindo eventual diminuição dos custos dos tratamentos antitrombóticos.

**BIBLIOGRAFIA**

- [1] McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol* 1916;41:250-7.
- [2] Blake OR, Ashwin JG, Jaques IB. An assay for the antithrombotic activity of anticoagulants. *J. Clin Path* 1958;12:118-22.
- [3] Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Söderströ G. Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X: effect of heparin neutralization in plasma. *Thromb Res* 1979;15:531-41.
- [4] Harenberg J. Pharmacology of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost* 1990;16(suppl):2-8.
- [5] Rosenberg RD, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1218-22.
- [6] Lindahl U, Bäckström G, Höök M, Thunberg L, Fransson LA, Linker A. Structure of the antithrombin-binding site of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3198-202.
- [7] Machovich R, Arányi P. Effect of heparin on thrombin inactivation by antithrombin-III. *Biochem J* 1978;173:869-75.
- [8] Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973;248:6490-505.
- [9] Hirsh J, Fuster V. Guide to anticoagulant therapy part 1: Heparin. *Circulation* 1994;89:1449-68.
- [10] Oosta GM, Gardner WT, Beeler DL, Rosenberg RD. Multiple functional domains of the heparin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:829-33.

- [11] Lindahl U, Thunberg L, Bäckström G, Riesenfeld J, Nordling K, Björk I. Extension and structural variability of thrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1984;259:12368-76.
- [12] Lane DA. Heparin binding and neutralizing proteins. In: Lane DA, Lindahl U (ed) *Heparin: chemical and biological properties, clinical applications*. 1<sup>o</sup> ed. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 363-91.
- [13] Weitz JI. Low molecular weight heparins. *N Engl J Med* 1997;337:688-98.
- [14] Holmer E, Söderberg K, Bergqvist D, Lindahl U. Heparin and its low molecular weight derivatives: anticoagulant and antithrombotic properties. *Haemostasis* 1986;16(suppl 2):1-7.
- [15] Gori AM, Pepe G, Attanasio M, Falciani M, Abbate R, Prisco D, Fed S, Giusti B, Brunelli T, Comeglio P, Gensini GF, Neri Serneri GG. tissue factor reduction and tissue factor pathway inhibitor release after heparin administration. *Thromb Haemost* 1999;81:589-93.
- [16] Sandset P, Abildgaard U, Larsen M. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1988;50:803-13.
- [17] Bara L, Bloch M, Zitoun D, Samama M, Collignon F, Frydman A, Uzan A, Bouthier J. Comparative effects of enoxaparin and unfractionated heparin in healthy volunteers on prothrombin consumption in whole blood during coagulation, and release of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 1993;69:443-52.
- [18] Holm HA, Ly B, Handeland GF, Abildgaard U, Arnesen KE, Gottschalk P, Hoeg V, Aandahl M, Haugen K, Laerum F. Subcutaneous heparin

treatment of deep venous thrombosis: a comparison of unfractionated and low molecular weight heparin. *Haemostasis* 1986;16(suppl 2):30-7.

[19] Andrassy K, Eschenfelder V. Are the pharmacokinetic parameters of low molecular weight heparins predictive of their clinical efficacy? *Thromb Res* 1996;81(suppl 2):29-38.

[20] Levine M, Gent M, Hirsh J, Leclerc J, Anderson D, Weitz J, Ginsberg J, Turpie AG, Demers C, Kovacs M. A comparison of low-molecular-weight heparin administered primarily at home with unfractionated heparin administered in the hospital for proximal deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996;334:677-81.

[21] Horne MK, Chao ES. The effect of molecular weight on heparin binding to platelets. *Br J Haematol* 1990;74:306-12.

[22] Perez-Requejo JL, Solano OL, Garcia MP, Santarelli MT. Very low doses of unfractionated heparin potentiate the anti-Xa activity of low molecular weight heparin (enoxaparin). *Thromb Res* 1997;85:259-65.

[23] Altman R, Scazziota A, Rouvier J. Efficacy of unfractionated heparin, low molecular weight heparin, and both, combined for releasing total and free tissue factor pathway inhibitor. *Haemostasis* 1998;28:229-35.

[24] Reyers I, Mussoni L, Donati MB, Gaetano G. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. *Thromb Res* 1980;18:669-74.

[25] Carvalho I, Thomazini IA, Maffei FHA, Curi PR, Mattar L. Trombose venosa experimental por ligadura de veia cava no rato: comparação entre

diferentes técnicas. VII Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu. Annais1992 p. 69.

[26] Lavelle SM, MacLomhair M. Bleeding time and the antithrombotic effects of high- dose aspirin and heparin in rats. Ir J Med Sci 1998;167:216-20.

[27] Stella L, Donatti MB, Gaetano G. Bleeding time in laboratory animals. I. Aspirin does not prolong bleeding time in rats. Thromb Haemost 1975;7:709-16.

[28] Palm M, Mattsson C, Svahn CM, Weber M. Bleeding times in rats treated with heparin, heparin fragments of high and low anticoagulant activity and chemically modified heparin fragments of low anticoagulant activity. Thromb Haemost 1990;64:127-32.

[29] Dejana E, Callioni A, Quintana A, Gaetano G. Bleeding time in laboratory animals. II – a comparison of different assay conditions in rats. Thromb Res 1979;15:191-7.

[30] Dejana E, Callioni A, Quintana A, Gaetano G. Bleeding time in laboratory animals. III - do tail bleeding times in rats only measure a platelet defect? (The aspirin puzzle). Thromb Res 1979;15:199-207.

[31] Curi PR, Moraes RV. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. Ciência e Cultura 1981;33:712-22.

[32] Fisher LD, Van Belle G. Biostatistics: A methodology for the health sciences. New York Wiley-Interscience 1993; p. 991.

[33] Young E, Wells P, Holloway S, Weitz J, Hirsh J. Ex-vivo and in-vitro evidence that low molecular weight heparins exhibit less binding to plasma



proteins than unfractionated heparin. *Thromb Haemost* 1994;71:300-4.

[34] Ofosu FA, Blajchman MA, Modi GJ, Smith LM, Buchanan MR. The importance of thrombin inhibition for the expression of the anticoagulant activities of heparin, dermatan sulphate, low molecular weight heparin and pentosanpolysulphate. *Br J Haematol* 1985;60:695-704.

[35] Broze G, Warren L, Novotny W, Higuchi D, Girard J, Miletich J. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988;71:335-43.

[36] Broze GJ. Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Thromb Haemost* 1995;74:90-3.

[37] Novotny W, Girard T, Miletich J, Broze G. Purification and characterization of the lipoprotein associated coagulation inhibitor from human plasma. *J Biol Chem* 1989;264:18832-7.

[38] Bajaj M, Kuppuswamy M, Saito H, Spitzer S, Bajaj S. Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of this synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8868-73.

[39] Novotny W, Girard T, Miletich J, Broze G. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood* 1988;72:2020.

[40] Lesnik P, Vonica A, Guerin M, Moreau M, Chapman M. Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a).

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1993;13:1066-75.

[41] Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F. Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2251-62.

[42] Brown J, Kuter D. The effect of unfractionated vs. low molecular weight heparin on tissue factor pathway inhibitor levels in hospital patients. *Thromb Haemost* 2001;85:979-85.

[43] Nader HB, Buonassisi V, Colburn P, Dietrich CP. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cell. *J Cel Physiol* 1989;140:305-10.

[44] Pinhal MAS, Walenga JM, Jeske W, Hoppensteadt D, Dietrich CP, Fareed J, Nader HB. Antithrombotic agents stimulate the synthesis and modify the sulfation pattern of a heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. *Thromb Res* 1994;74:143-53.

[45] Pinhal MAS, Santos IAN, Silva IF, Dietrich CP, Nader HB. Minimum fragments of the heparin molecule able to produce the accumulation and change of the sulfation pattern of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. *Thromb Haemost* 1995;74:1169-74.

[46] Pinhal MAS, Trindade ES, Fareed J, Dietrich CP, Nader HB. Heparin and a cyclic octaphenol-octasulfonic acid (GL-522-Y-1) bind with high affinity to a 47-kDa protein from vascular endothelial cell surface and stimulate the synthesis and structural changes of heparan sulfate proteoglycan. *Thromb Res* 2001;103:35-45.

- [47] Miyake Y, Yokota K, Fujishima Y, Sukamoto T. The effects of danaparoid, dalteparin, and heparin on tissue factor-induced experimental disseminated intravascular coagulation and bleeding time in the rat. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12:349-57.
- [48] Elg M, Gustafsson D, Carlsson S. Antitrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rat. *Thromb Res* 1999;94:187-97.
- [49] Lavelle SM, Maclomhair M. Bleeding times and the antithrombotic effects of high-dose aspirin, hirudin and heparins in the rat. *Ir J Med Sci* 1998;167:216-20.
- [50] Palm M, Mattsson C, Svahn CM, Weber M. Bleeding times in rats treated with heparin, heparin fragments of high and low anticoagulant activity and chemically modified heparin fragments of low anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1990;64:127-32.
- [51] Mischke R, Nimmerfall K. Effect of a high single subcutaneous dose of unfractionated heparin on platelet function in dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2000;113:60-4.
- [52] Katsuura Y, Tanabe H, Kiyoshi M, Funatsu A. Comparison of hemorrhagic effect of heparin and human activated protein C with use of Thrombostat 4000. *Haemostasis* 1996;26:203-9.
- [53] Rao AK, Carvalho ACA. Acquired qualitative platelet defects. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed) *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia:JB Lippincott; 1994. p. 685-704.

- [54] Heiden D, Mielke CH, Rodvien R. Impairment by heparin of primary haemostasis and platelet [14 C]5-hydroxytryptamine release. *Br J Haematol* 1977;36:427-36.
- [55] Cruz WO. The significance of a smooth muscle component in hemostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965;119:876-83.
- [56] Cruz WO, Dietrich CP. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;126:420-6.
- [57] Nader HB, Dietrich CP. Effect of heparin sulfate fractions on hemostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:504-8.
- [58] Nader HB, Tersariol ILS, Dietrich CP. Structural requirements of heparin disaccharides responsible for hemorrhage: reversion of the antihemostatic effect by ATP. *FASEB J* 1989;3:2420-4.
- [59] Garcia HVJ, Buffolo E, Nader HB, Dietrich CP. ATP reduces blood loss produced by heparin in cardiopulmonary bypass operations. *Ann Thorac Surg* 1994;57:956-9.
- [60] Momi S, Nasimi M, Colucci M, Nenci GG, Gresele P. Low molecular weight heparins prevent thrombin-induced thromboembolism in mice despite low anti-thrombin activity. Evidence that the inhibition of feed-back activation of thrombin generation confers safety advantages over direct thrombin inhibition. *Haematologica* 2001;86:297-302.
- [61] Nimmerfall K, Mischke R. Effect of unfractionated and low-molecular-weight heparin on platelet aggregation and in vitro bleeding time in dogs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1999;106:439-44.

- [62] Monreal M, Galego G, Monreal L, Angles AM, Monasterio J, Oller B. Comparative study on the antithrombotic efficacy of hirudin, heparin and a low-molecular weight heparin in preventing experimentally induced venous thrombosis. *Haemostasis* 1993;23:179-83.
- [63] Melton LG, Dehmer GJ, Tate DA, Muga KM, Meehan A, Gabriel DA. Variable influence of heparin and contrast agents on platelet function as assessed by their in vitro bleeding time. *Thromb Res* 1996;83:265-77.
- [64] Khuri SF, Valeri CR, Loscalzo J, Weinstein MJ, Birjiniuk V, Healey NA, MacGregor H, Doursounian M, Zolkewitz MA. Heparin causes platelet dysfunction and induces fibrinolysis before cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1008-14.
- [65] Bang CJ, Riedel B, Talstad I, Berstad A. Haemorrhagic effect of enoxaparin, a low molecular weight heparin. Comparison with unfractionated heparin in humans. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:924-8.
- [66] de Boer A, Kroon JM, Kroon C, van Vilet A, Schoemaker HC, Breimer DD, Donoghue S, Cohen AF. Pronounced effects of the combination of a new thromboxane antagonist (GR 32191) and heparin on bleeding time in man. *Thromb Haemost* 1992;68:24-9.
- [67] Schulman S, Johnsson H. Heparin, DDAVP and the bleeding time. *Thromb Haemost* 1991;65:242-4.
- [68] Palareti G, Legnani C, Bianchini B, Guazzaloca G, Maccaferri M, Marabini A, De Iaco P, Marcozzi S, Mancini L, Orlandi C. Pharmacodynamic effects on blood coagulation of a new low molecular weight heparin (alfa-LMWH) in healthy volunteers and gynecological surgery patients. *Int Angiol*

1989;8:47-52.

[69] Harenberg J. Pharmacology of low molecular weight heparins. *Sem Thromb Hemost* 1990;16(suppl):12-8.

[70] Horlocker TT, Heit JA. Low Molecular Weight Heparin: Biochemistry, pharmacology, perioperative prophylaxis regimens, and guidelines for regional anesthetic management. *Anesth Analg* 1997;85:874-85.

[71] Laposata M, Green S, Van Cott EM, Barrowcliffe TW, Goodnight SH, Sosolik RC. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of anticoagulant Therapy. The Clinical Use and Laboratory Monitoring of Low-Molecular-Weight Heparin, Danaparoid, Hirudin and Related Compounds, and Argatroban. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:799-807.

## ANEXO

**Tabela 1 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo C (controle)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
3	480	73	117	0,0301	0,0271	NA	NA
13	363	150	159	0,0146	0,0045	14	22
20	375	173	405	0,0081	0,0027	15	26
26	320	120	117	0,0516	0,0401	13	30
29	380	132	142	0,0000	0,0000	13	25
34	280	123	109	0,0550	0,0375	12	22
43	270	115	128	0,0407	0,0193	15	25
46	240	166	173	0,0184	0,0053	14	21
48	320	215	135	0,0405	0,0123	16	22
58	310	177	268	0,0247	0,0078	17	25
70	370	109	128	0,0372	0,0124	NA	NA

NA – não avaliado

**Tabela 2 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo H<sub>350</sub> (heparina não fracionada 350 UI/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
6	510	80	137	0,0000	0,0000	350	59
11	363	132	166	0,0011	0,0006	77	38
17	340	197	279	0,0000	0,0000	350	66
27	350	126	247	0,0000	0,0000	350	87
28	360	143	351	0,0000	0,0000	350	63
42	260	134	133	0,0000	0,0000	75	39
52	300	223	266	0,0000	0,0000	82	35
57	290	160	121	0,0088	0,0027	350	45
59	370	117	134	0,0000	0,0000	350	64
66	380	144	154	0,0000	0,0000	350	50

**Tabela 3 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo E<sub>2</sub> (enoxaparina 2,0 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
5	520	96	160	0,0048	0,0027	21	28
10	372	125	133	0,0258	0,0209	14	24
14	362	229	109	0,0000	0,0000	17	26
24	370	100	182	0,0000	0,0000	23	25
32	315	100	128	0,0000	0,0000	15	36
36	270	153	140	0,0000	0,0000	NA	NA
37	230	104	111	0,0000	0,0000	27	31
45	240	123	122	0,0000	0,0000	16	22
51	290	146	126	0,0000	0,0000	NA	NA

NA – não avaliado

**Tabela 4 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo H<sub>175</sub> (heparina não fracionada 175 UI/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
4	530	81	178	0,0000	0,0000	45	29
9	338	80	198	0,0120	0,0044	13	23
19	360	153	320	0,0071	0,0021	15	29
21	403	156	170	0,0045	0,0013	19	35
22	340	91	142	0,0057	0,0047	350	58
30	300	90	121	0,0000	0,0000	17	27
35	280	124	87	0,0012	0,0005	22	32
39	250	138	126	0,0000	0,0000	55	34
50	292	144	158	0,0353	0,0081	23	25
55	290	124	128	0,0003	0,0001	350	25



**Tabela 5 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo E<sub>1</sub> (enoxaparina 1 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
2	500	75	135	0,0000	0,0000	17	26
8	364	119	125	0,0148	0,0051	15	25
16	365	175	215	0,0108	0,0043	NA	NA
25	340	139	213	0,0003	0,0001	14	29
31	330	287	152	0,0000	0,0000	13	22
41	240	140	169	0,0017	0,0005	15	25
49	290	164	155	0,0002	0,0001	30	28
54	300	128	138	0,0000	0,0000	51	26
60	360	108	242	0,0083	0,0032	13	19
69	350	114	151	0,0159	0,0057	NA	NA

NA – não avaliado

**Tabela 6 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo H<sub>175</sub> + E<sub>1</sub> (heparina não fracionada 175 UI/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
7	470	157	155	0,0000	0,0000	350	48
12	400	156	250	0,0000	0,0000	150	46
15	370	109	493	0,0000	0,0000	74	42
38	270	176	150	0,0000	0,0000	26	26
44	270	116	161	0,0000	0,0000	350	36
47	296	143	129	0,0000	0,0000	350	36
62	350	106	153	0,0000	0,0000	350	123
65	350	152	158	0,0000	0,0000	115	31
67	370	120	129	0,0000	0,0000	350	67
68	360	112	231	0,0058	0,0025	214	32

**Tabela 7 – Peso corporal, TS inicial, TS final, peso dos trombos fresco e seco, TT e TTPA, de cada animal do Grupo H<sub>100</sub> + E<sub>0,5</sub> (heparina não fracionada 100 UI/Kg + enoxaparina 0,5 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS inicial (s)	TS final (s)	Peso do trombo fresco (g)	Peso do trombo seco (g)	TT (s)	TTPA (s)
1	445	133	155	0,0082	0,0050	13	26
18	380	159	285	0,0000	0,0000	53	37
23	380	199	172	0,0075	0,0029	59	30
33	300	156	150	0,0000	0,0000	19	30
40	260	158	124	0,0000	0,0000	23	26
53	300	121	131	0,0000	0,0000	350	33
56	297	107	297	0,0000	0,0000	350	31
61	320	115	118	0,0000	0,0000	22	20
63	360	151	105	0,0098	0,0033	16	21
64	370	117	112	0,0000	0,0000	14	21

**Tabela 8 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal do Grupo C' (controle sem indução da trombose)**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 73	330	123	16	24
Rato 80	320	226	13	21
Rato 84	390	185	15	59
Rato 93	300	152	15	22
Rato 99	380	225	15	25
Rato 103	380	144	15	23
Rato 115	440	154	12	20

**Tabela 9 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal do Grupo H' <sub>350</sub> (heparina não fracionada 350 UI/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 71	350	285	360	170
Rato 83	380	237	360	114
Rato 87	390	179	360	122
Rato 96	330	288	360	224
Rato 110	420	194	360	86
Rato 111	426	171	360	93
Rato 116	402	334	360	138

**Tabela 10 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal do Grupo E<sub>2</sub> (enoxaparina 2,0 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 76	330	200	74	46
Rato 78	320	227	25	36
Rato 85	300	138	27	28
Rato 90	320	131	142	41
Rato 94	350	193	41	41
Rato 102	380	140	28	30
Rato 113	390	190	38	112

**Tabela 11 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal do Grupo H<sub>175</sub> (heparina não fracionada 175 UI/kg):**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 72	360	181	158	50
Rato 77	320	287	360	82
Rato 86	340	210	360	63
Rato 89	350	188	360	66
Rato 97	390	164	87	39
Rato 105	350	155	190	55
Rato 112	415	163	76	40

**Tabela 12 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal do Grupo E<sub>1</sub> (enoxaparina 1,0 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 74	300	199	20	38
Rato 91	410	258	43	37
Rato 98	360	201	27	33
Rato 104	360	178	21	29
Rato 106	390	276	16	29
Rato 109	389	171	20	25
Rato 117	350	159	28	28

**Tabela 13 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal Grupo H'175 + E1 (heparina não fracionada 175 mg/kg + enoxaparina 1,0 mg/kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 75	380	260	360	84
Rato 79	360	237	360	69
Rato 92	320	165	360	89
Rato 100	340	186	118	57
Rato 107	396	205	360	44
Rato 114	365	183	360	52

**Tabela 14 – Peso corporal, TS, TT e TTPA, 40 minutos após a medicação, de cada animal do Grupo H'100 + E0,5 (heparina não fracionada 100 UI/kg + enoxaparina 0,5 mg/Kg)**

Animal	Peso do animal (g)	TS 40 (s)	TT (s)	TTPA (s)
Rato 81	350	220	150	58
Rato 82	320	118	91	41
Rato 88	350	166	360	53
Rato 95	360	186	161	59
Rato 101	330	181	360	110
Rato 108	398	206	360	55
Rato 118	427	194	360	45