

CC 321

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA CIRÚRGICA  
DISCIPLINA DE TÉCNICA OPERATÓRIA E CIRURGIA EXPERIMENTAL**

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA  
ANTITROMBÓTICA DA HEPARINA CONVENCIONAL E  
DA HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR**

**FLORIANÓPOLIS  
1994**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA CIRÚRGICA  
DISCIPLINA DE TÉCNICA OPERATÓRIA E CIRURGIA EXPERIMENTAL**

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA  
ANTITROMBÓTICA DA HEPARINA CONVENCIONAL E  
DA HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR**

**Orientador: Prof. Dr. Pierre G. Silveira  
Aluno: Agamenon H. de Bittencourt**

**FLORIANÓPOLIS  
1994**

AGRADECIMENTOS:  
Ao Biotério Central da UFSC  
Prof. Dr. Pierre G. Silveira  
Prof. Dr. Gilberto Galego

## RESUMO

Em um estudo randomizado e duplo cego comparamos a eficácia antitrombótica (redução do peso do trombo) de duas heparinas; uma de baixo peso molecular e outra não fracionada. Foram utilizados dois métodos distintos de trombose venosa experimental: no grupo I a trombose venosa foi induzida injetando-se oleato de etanolamina na veia jugular de 30 coelhos e glicose a 50% em mais 30, todos da raça New Zealand. No Grupo II a trombose venosa foi induzida por estase mediante a ligadura da veia cava de 30 ratos da raça Wistar. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas com relação à redução do peso do trombo em ambos os grupos. Também concluímos que a eficácia antitrombótica das drogas estudadas não variou conforme o tipo de estímulo indutor da trombose nos modelos testados, e que o oleato de etanolamina induziu de forma mais significativa a formação de trombos no grupo I.

## ABSTRACT

A prospective randomized double-blind trial was performed, comparing the efficacy antithrombotic (reduction of weight thrombi) of two heparines with low molecular weight and unfractionated calcium heparine. Were used two different models of experimental venous thrombosis: in the first group, a combination of endothelial injury and flow reduction, was used to induce jugular vein thrombosis in New Zealand rabbits, 30 with etanolamine, and other 30 with glucose 50%. In the second group, venous stasis was used to induce cava vein thrombosis in 30 female Wistar rats. No significant differences on reduction of thrombus weight was found on both groups. There was no relationship between thrombotic agents and experimental thrombosis model. Etanolamin induced more significantly thrombosis on group I.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	03
	<b>ABSTRACT</b> .....	04
1.	INTRDUÇÃO.....	06
✓2.	OBJETIVOS.....	08
×3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	09
4.	RESULTADOS.....	11
5.	DISCUSSÃO.....	16
✓6.	CONCLUSÃO.....	18
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

## 1.- INTRODUÇÃO

O tromboembolismo venoso é uma temida e freqüente complicação dos pacientes hospitalizados. Atualmente nos EUA, se produzem por ano aproximadamente 630000 casos de tromboembolismo pulmonar. Destes, 11% (67000) morrem vítimas de um tromboembolismo pulmonar maciço<sup>1,2</sup>, sendo que a maioria dos óbitos ocorre antes mesmo do paciente ser diagnosticado ou receber tratamento adequado.

Considerando estes dados, não se discute a importância da profilaxia da doença tromboembólica venosa. Para tal, dispomos de diferentes métodos profiláticos, mecânicos e farmacológicos. Dentre os métodos farmacológicos destacam-se as heparinas.

A heparina é uma macromolécula que foi descoberta por Jay Mclean <sup>3</sup>, durante a preparação de extratos de tromboplastina de diferentes tecidos, quando observou que alguns deles tinham um poderoso efeito anticoagulante. Howell e Holt <sup>4</sup> em 1918 descreveram pela primeira vez as características deste anticoagulante e o chamaram heparina (do grego hepar=figado), devido a sua abundante concentração no tecido hepático. Logo a heparina passou a ter um valor inquestionável no tratamento e posteriormente na profilaxia da trombose venosa.

Todos os métodos experimentais de trombose venosa tomam a tríade de Virchow<sup>5</sup> (lesão endotelial, estase e hipercoagulabilidade) como base para estudos experimentais da doença tromboembólica venosa e sua profilaxia.

O primeiro modelo experimental animal de formação de trombose foi descrito por Wessler<sup>6</sup>. O método de indução do trombo consistiu em provocar a estase venosa mediante a ligadura de uma veia de um cão ou de um coelho. Em seguida injetou-se soro humano, canino ou de coelho através de uma veia contralateral na perna ou na orelha do animal. Os

modelos de estase venosa foram também testados em ratos<sup>7,8</sup>, mediante ligadura da veia cava inferior.

Freidman<sup>9</sup> descreveu um modelo, posteriormente modificado por Kumada<sup>10</sup>, que consistia na introdução de um corpo estranho na veia cava inferior de ratos.

Outro método de trombose venosa experimental proposto por Peterson e Zucker<sup>11</sup> em 1970, associava lesão endotelial e redução do fluxo sanguíneo, em segmentos da veia femoral do coelho com lesão endotelial produzida por morruato de sódio.

Este modelo foi modificado por Björck et al<sup>12</sup>, que adaptou-o a utilização de veia jugular em lugar de femoral.

A partir da estandarização destes modelos de trombose venosa experimental, foi possível o estudo em laboratório das distintas heparinas. Doutremepuich<sup>13</sup>, provocando estase em veia cava inferior de ratas, concluiu que HBPM inibe a formação do trombo com uma única dose, ao contrário da heparina convencional (HC). Boneu<sup>14</sup>, em outro modelo experimental, concluiu que as HBPM são tão eficazes quanto a HC na prevenção e estabilização da trombose. Bergqvist<sup>15</sup> verificou que é possível prevenir a formação de trombos com HBPM em coelhos com lesão endotelial. Diness<sup>16</sup>, em um estudo experimental em coelhos, comparando a eficácia antitrombótica entre distintas heparinas, obteve resultados semelhantes.

Os estudos clínicos realizados também confirmaram a eficácia da profilaxia realizada com heparina, como ficou demonstrado no estudo de Collins<sup>17</sup>, que em uma meta análise de mais de 70 séries randomizados, com um total de 16.000 pacientes demonstrou que o uso pré-operatório de heparina subcutânea pode prevenir cerca de metade de todas as embolias pulmonares e cerca de dois terços de todas as trombozes venosas profundas.

O mesmo podemos afirmar com relação as HBPM, como no estudo multicêntrico realizado na Europa em 1988, com uma série de 1909 pacientes submetidos a cirurgia abdominal<sup>18</sup>.

Com a intenção de avaliar uma das preparações comerciais da HBPM disponíveis no Brasil, desenhamos um estudo experimental randomizado e duplo cego, comparando-a com a heparina convencional.



## **2.- OBJETIVOS**

1. Comparar, em um modelo experimental, a eficácia antitrombótica da heparina convencional e da HBPM, entre si e com um placebo, através da determinação do número e do peso dos trombos formados.

2. Averiguar se o comportamento das heparinas difere segundo o método de indução da trombose.

3. Comparar a capacidade formadora de trombo da glicose a 50% e do oleato de etanolamina em um dos métodos de trombose venosa experimental (lesão endotelial e estase).

### 3.- MATERIAL E MÉTODOS

As soluções estudadas foram colocadas em frascos numerados, sendo seu código de posse do pessoal técnico do laboratório.

- Soluções estudadas:
1. Liquemine<sup>R</sup> ( heparina Ca 5000 U) Roche
  2. Fraxiparina<sup>R</sup> ( hbpm 4.500 daltons) Sanofi
  3. Controle: solução de cloreto de sódio a 0,9%

As doses foram ajustadas ao peso dos animais de acordo com a prática clínica em humanos.

Foram usados 60 coelhos e 30 ratos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os coelhos, da raça New Zealand, de ambos os sexos pesavam de 2,5 a 3,0 quilos e as ratas Wistar pesavam entre 250 a 300 gramas. Foram alimentados com dieta padrão e água "ad libidum" até 12 horas antes da cirurgia.

As soluções foram injetadas via subcutânea 2 horas antes da cirurgia.

Todos os animais foram anestesiados com uma solução de 50mg/ml de cloridrato de quetamina (Ketalar<sup>R</sup>) e 0,02 mg/ml de Ropum<sup>R</sup>, tendo como medicação pré-anestésica diazepam.

Os animais foram divididos em dois modelos experimentais:

Modelo 1 - método de Peterson e Zucker<sup>11</sup> modificado (60 coelhos da raça New Zealand).

A trombose foi induzida por lesão endotelial em veia jugular, com oleato de etanolamina em 30 e glicose a 50% nos outros 30 coelhos.

?x A veia jugular foi exposta através de uma incisão cervical transversa. Um segmento de 1 cm de comprimento da veia foi isolado entre 2 clamps e o seu ramo facial canulado com um Abbocath<sup>R</sup> 23. O segmento foi lavado com soro fisiológico 0.9% e depois enchido com oleato de etanolamina em 30 animais e glicose a 50% nos outros 30, que aí permaneceu por 5 minutos. Após este período o segmento era lavado, os clamps abertos e passada uma ligadura estenosante distal do calibre do abbocath.

Depois de 30 minutos a veia foi isolada, aberta longitudinalmente e inspecionada macroscopicamente.

O trombo, quando presente, foi imediatamente removido e pesado, e o animal sacrificado.

Modelo 2 - Método de Reyes<sup>7</sup> (30 ratas raça Wistar).

A trombose foi induzida com estase por ligadura oclusiva da veia cava inferior. A cavidade abdominal foi aberta por laparotomia mediana longitudinal, a veia renal esquerda, isolada, e abaixo desta, ligada a veia cava inferior.

A cavidade foi fechada e reaberta 6 horas após. Um segmento da veia cava inferior de 1,5 cm de comprimento foi isolado, aberto e o trombo quando presente retirado e imediatamente pesado.

Avaliação dos resultados: todos os trombos foram pesados em uma balança de precisão e avaliados quanto a sua presença, de acordo com o fator tromboprotetor (TPF), escrito por Maggi e Abbadini<sup>19</sup>.

## 4.- RESULTADOS

### **Grupo I:** lesão endotelial e estase

A maioria dos animais deste grupo desenvolveu trombo (52 animais). Um bom efeito tromboprotetor foi obtido com HC em comparação com placebo no oleato de etanolamina (  $p < 0,013$ ), o que não ocorreu com a glicose 50% (  $p > 0,17$  ). Resultados significativos foram obtidos com a HBPM em comparação com o placebo ( oleato de etanolamina:  $p < 0,0009$  e glicose 50%:  $p < 0,04$  ). Contudo, não houve diferença significativa entre a HC e a HBPM ( oleato de etanolamina:  $p > 0,64$  e glicose 50%:  $p > 0,68$  ).

Tabela 1.- Média dos pesos dos trombos\*

	animais (n°)	Peso do trombo (mg)	p
Placebo	10	14,18 +/- 3,98	-
HC	10	8,36 +/- 5,50	0,013
HBPM	10	7,40 +/-3,37	0,0009

\* (oleato de etanolamina)

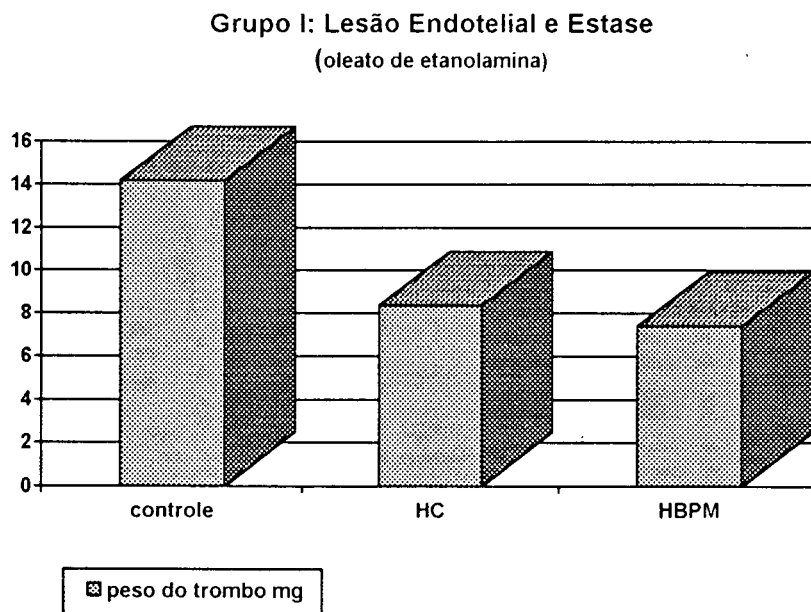
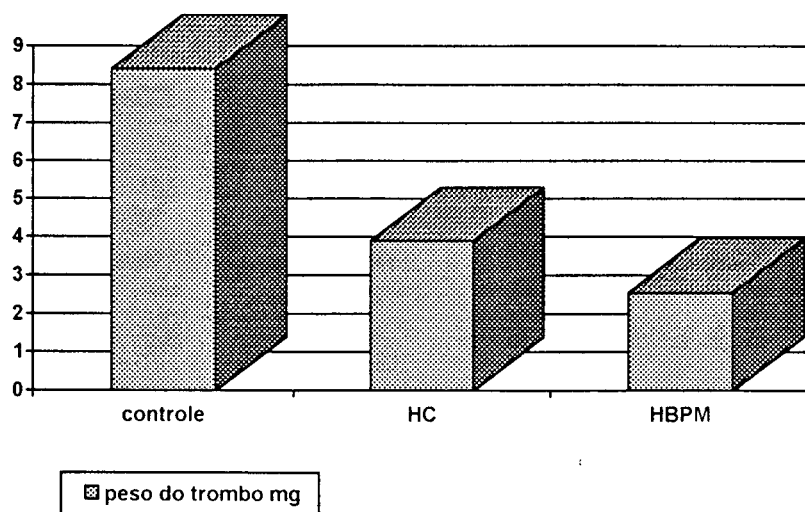


Tabela 2- Média dos pesos dos trombos\*\*

	animais (n <sup>o</sup> )	Peso do trombo(mg)	p
Placebo	10	8,40 +/- 5,83	-
HC	10	3,90 +/- 8,22	0,17
HBPM	10	2,55 +/- 6,20	0,04

\*\* (glicose 50%)

Grupo I: Lesão Endotelial e Estase  
(glicose 50%)



## Grupo II: estase

Neste grupo a maioria dos animais não desenvolveu trombo. A atividade tromboprotetora foi significativa quando comparados controle e HC (  $p < 0,001$  ), o que também ocorreu entre o controle e a HBPM (  $p < 0,003$  ). Já entre a HC e a HBPM não houve diferença estatisticamente significativa (  $p > 0,58$  ).

Tabela 3- Média dos pesos dos trombos

	animais (n°)	Peso do trombo(mg)	p
Placebo	9	0,98 +/- 0,77	
HC	10	0,01 +/- 0,03	0,001
HBPM	9	0,05 +/- 0,16	0,003

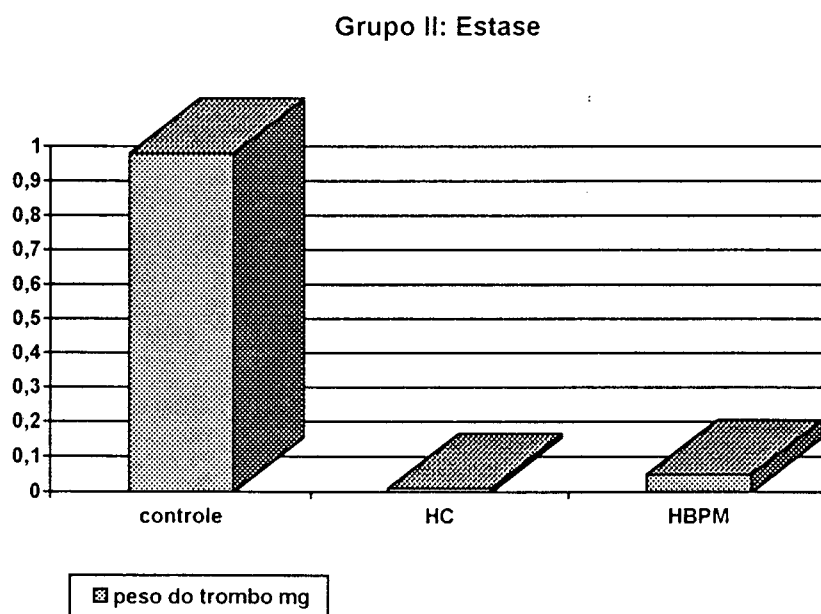
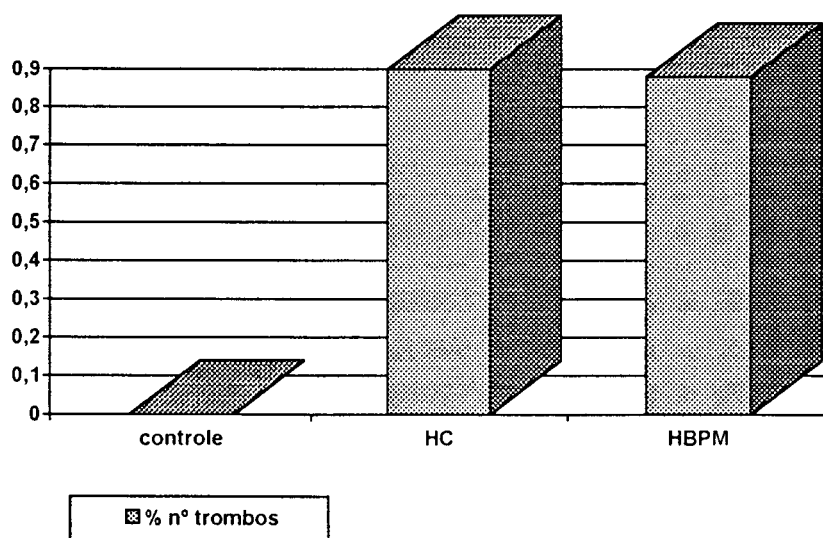


Tabela 4 - Grupo II ESTASE - Fator Tromboprotetor (%)

	nº de animais	nº de trombos	fator tromboprotetor(%)
Placebo	9	9	0,
HC	10	01	0,9
HBPM	9	01	0,88

Grupo II: Estase Fator Tromboprotetor (%)





## 5.- DISCUSSÃO

A profilaxia da doença tromboembólica venosa vem sendo feita com a heparina há mais de 50 anos e apesar disto os métodos farmacológicos e mecânicos utilizados continuam sendo tema de exaustivas discussões e pesquisa de diversos autores.

O interesse pelas HBPM, como agente antitrombótico, cresceu a partir do estudo de Johnson et al em 1976. Neste estudo observou-se que os níveis de atividade anti-Xa no plasma, nos pacientes que haviam recebido HBPM, eram 4 vezes maiores quando comparados aos que receberam a heparina não fracionada. Em outros estudos também ficou demonstrado que as complicações hemorrágicas eram pouco freqüentes, às custas de uma menor inibição da função plaquetária pelas HBPM. Por último, a biodisponibilidade e a vida média destas heparinas seria maior, o que permitiria uma única aplicação diária para obter uma boa trombopprofilaxia<sup>20,21,22,13,23</sup>.

Considerando-se que a eficácia destas drogas pode ser avaliada somente através de estudos clínicos, até hoje não contamos com evidências consistentes de que uma droga é superior a outra. Isto só poderia ser conseguido comparando a eficácia destes agentes sob condições clínicas idênticas, exigência impossível de ser conseguida na prática médica, mas possível em estudos experimentais.

Nos estudos experimentais, diferentes modelos vêm sendo utilizados, com uma grande variação nos resultados. Recentemente, Fareed et al, em um estudo experimental idêntico em coelhos, comparou a ação antitrombótica intravenosa e subcutânea de várias heparinas<sup>24</sup>. Todas as drogas foram testadas em doses anti-Xa idênticas demonstrando uma ação antitrombótica menor da heparina não fracionada. Em nosso estudo procuramos reproduzir situações clínicas em que dois dos componentes da tríade de Virchow estivessem

isoladamente em evidência (em alguns estudos experimentais prévios a trombose foi induzida sem individualizar-se sua etiologia, por exemplo no estudo de Holmer 1982), na tentativa de comparar o comportamento das diferentes heparinas segundo o estímulo indutor da trombose<sup>25</sup>.

Ao contrário de Fareed, utilizamos doses iguais às recomendadas na prática clínica. Finalmente usamos dois tipos de animais (coelhos e ratos), pois o modelo de indução da trombose mediante a ligadura de veia cava só está descrito em ratos. No modelo de lesão endotelial e estase utilizamos distintas drogas para a indução da trombose (oleato de etanolamina e glicose a 50%), com a intenção de averiguar que substância se comportaria melhor para a avaliação dos trombos conseguidos.

A partir de nossos resultados podemos concluir que nos dois modelos experimentais utilizados a ação tromboprotetora de ambas heparinas foi estatisticamente significativa quando comparada ao placebo. Entretanto a comparação entre os dois tipos de heparina não demonstrou diferença significativa. Também não foi conclusivo se as drogas apresentavam comportamento distinto com relação ao estímulo indutor da trombose, ao contrário da literatura, que descreve uma diminuição da atividade tromboprotetora das heparinas quando o estímulo indutor é a lesão endotelial.

Quanto aos resultados das drogas utilizadas na indução da trombose, concluímos que a glicose a 50% apresenta-se menos lesiva ao endotélio vascular, traduzindo-se na formação de trombos menores, facilitando a avaliação dos resultados.

## **6.- CONCLUSÕES**

- 1.- Nos dois métodos conseguimos induzir a formação de trombose em todos animais do grupo placebo assim como na maioria dos animais tratados com heparina profilática.
- 2.- A média dos pesos dos trombos nos dois métodos mostrou diferenças significativas entre o grupo placebo e a maioria dos animais que receberam heparina profilática.
- 3.- Por outro lado as diferenças das médias dos pesos dos grupos de animais que receberam distintos tipos de heparinas não foram estatisticamente significativas.
- 4.- A substância oleato de etanolamina demonstrou maior capacidade trombogênica quando comparada à glicose a 50%.

## 7.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DALEN, J. E.; ALPERT, J. S. Natural history of pulmonary embolism. *Porg Cardiovasc Dis* 1975; 17: 259-270.
2. BELL, W. R.; SIMON, T. L. Current status of pulmonary thromboembolic disease: pathophysiology, diagnosis, prevention and treatment. *Am Heart J* 1982; 103:239-262.
3. McLEAN, J. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Phisiol* 1916; 41: 250-257
4. HOWELL, W. H. E HOLT, E. Two new factors in blood coagulation: heparin and antithrombin. *Am J Phisiol* 1918; 47: 328-341.
5. VIRCHOW, R.. *Gesammelte Abhaldlungen zur Wisseschaftlichen Medizin*. Von Meinige Sohn, Frankfurt a M. 1856.
6. WESSLER, S. Thrombosis in the presence of vascular stasis. *Am J Med* 1962; 33:648.
7. REYES, I.; MUSSONI, L.; DONATTI, M. B.; DE GAETANO, G. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. *Tromb Res* 1980; 18:669 - 674.

8. DOUTREMEPUICH, C.; TOULEMONDE, F.; DE SEZE, O.; PEREIRA, F.; ANNE, M. C. and DOUTREMEPUICH, F. Influence of heparin and a low molecular weight heparin fraction of the leukocytes in an experimental venous thrombosis model. *Journal of leucocyte biology* 42: 628 - 631 (1987).
9. FREIDMAN, M.; BYERS, S. O. and PEARL, F. Experimental production of intra arterial and intravenous thrombi in the rabbit and rat. *Amer J. Physiol.* 199: 770-774, 1960.
10. KUMADA, T.; ISHIHARA, M.; OGAWA, H.; ABIKO, Y. Experimental model of venous thrombosis in rats and effects of some agents. *Thrombosis Research* 18: 189 203, 1980.
11. PETERSON, J.; ZUCKER, M. B. The effects of adenosine monophosphate, arcaïne and anti-inflammatory agents on thrombosis and platelet function on rabbits. *Thromb. Diath Haemorrh* 1970; 23: 148-158.
12. BJÖRCK, C. G.; BERGQVIST, D.; ESQUIVEL, C.; NILSSON, B.; RUDSVIK, Y. Effects of heparin, low molecular weight (LMW), heparin and an heparin analogue on experimental venous thrombosis in the rabbit. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 629-633.
13. DOUTREMEPUICH, C.; GESTREAU, J. C.; MAURY, M. O.; QUILICHINI. Experimental venous thrombosis in rats treated with heparin and a low molecular weight heparin fraction. *Haemostasis* 13, 105-112 (1983).
14. BONEU, B.; BUCHANAN, M. R.; CADE, J. R.; VAN RYN, J. Effects of heparin, its low molecular weight fractions and others glycosaminoglycans on thrombus growth in vivo. *Thrombosis Research* 40; 81 - 89; 1985.

15. BERGQVIST, Nilson B.; HEDNER, U.; PEDERSEN, P. and OSTEGAARD, P. B.  
The effects of heparin fragments of different molecular weights on experimental thrombosis and haemostasis. *Thrombosis Research* 38; 589 - 601, 1985.
16. DINESS, V.; NIELSEN, J. I.; PEDERSEN, P. C.; WOLFFHANDT, K. H.; OSTEGAARD, P. B. A comparison of the antithrombotic and haemorrhagic effects of a low molecular weight heparin (LHN - 1) and a conventional heparin. *Thrombosis and haemostasis* 55 (3); 410 - 414 (1986).
17. COLLINS, R. Reduction in fatal pulmonary embolism and venous thrombosis by perioperative administration of subcutaneous heparin. *The New England Journal of Medicine*, May 5, 1162 - 1173 (1988).
18. The European Fraxiparin Study group. Comparación entre la heparina de bajo peso molecular y la heparina no fraccionada en la prevención de la trombosis venosa profunda en pacientes sometidos a cirugía abdominal *Br J Surg* vol 75, 112 - 118 (1988).
19. MAGGI, A.; ABBADINI, M. Experimental venous thrombosis in rats: A new way to express the results. *Thromb Haemostas* 1986;56(3)419-420.
20. KAKKAR, V. Prevention of venous thrombosis and pulmonary embolism. *Am J Cardiol* 1990; 65: 50c-54c.
21. JOHNSON, E. A.; KIRKWOOD, J. G.; STIRLING, Y et al. Four heparin preparations: anti Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. *Thrombosis and Haemostasis* 1976; 35: 586-591.

22. FERNANDEZ, F. A.; BUCHANAN, M. R.; HIRSH, J.; FENTON, I. J. W.; OFOSU, F.A.. Catalysis of thrombin inhibition provides an index for estimating the antithrombotic potential of glycosaminoglycans in rabbits. *Thromb Haemostas* 1987; 57:286-293.
23. BARA, L., SAMAMA, M. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins. *Acta Chir Scand* 1988; Supl 543:65-72.
24. FAREED, J.; WALENGA, J. M.; HOPPENSTEADT, D.; HUAN, X.; RCANELLI, A. Comparative study on the in vitro and in vivo activities of seven low molecular weight heparins. *Haemostasis* 1988; 18 (suppl.3) pp. 3-15.
25. HOLMER, E.; MATTSON, C.; NILSSON, S.: Anticoagulant and antithrombotic effects of heparin and low molecular weight heparin fragments in rabbits. *Thromb Res* 1982;25:475-485.

**TCC  
UFSC  
CC  
0321**

**Ex.1**

**N.Cham. TCC UFSC CC 0321**

**Autor: Bittencourt, Agame**

**Título: Estudo comparativo da eficácia a**



972813428

Ac. 253143

**Ex.1 UFSC BSCCSM**