

Universidade de Mogi das Cruzes
Beatriz Jordão Alves

**EFEITO DE DERIVADOS DA HEPARINA SOBRE AS ARRITMIAS
INDUZIDAS ELETRICAMENTE EM ÁTRIO DIREITO ISOLADO DE
RATO.**

Mogi das Cruzes, SP.
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de Mogi das Cruzes
Beatriz Jordão Alves

**EFEITO DE DERIVADOS DA HEPARINA SOBRE AS ARRITMIAS
INDUZIDAS ELETRICAMENTE EM ÁTRIO DIREITO ISOLADO DE
RATO.**

Dissertação apresentada à banca
examinadora montada pela comissão de Pós
Graduação em Engenharia Biomédica da
Universidade de Mogi das Cruzes.

Prof. Orientador: Dr. Afonso Caricati Neto

Mogi das Cruzes, SP.
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Alves, Beatriz Jordão

Efeito inibitório de derivados da heparina em arritmias induzidas eletricamente no átrio direito de rato / Beatriz Jordão Alves. – 2009.

76 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof^o. Dr^o. Afonso Caricati Neto

1. Heparina - Fragmentos 2. Arritmia 3.
Eletoestimulação 4. Medicina experimental I. Caricati
Neto, Afonso

CDD 619.93

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO Mestrado
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

No dia 31/03/09 a candidata *Beatriz Jordão Alves*, após realizar os créditos exigidos, ser aprovada no exame de Proficiência em Inglês, e no exame de Qualificação, apresentou o trabalho "Efeito inibitório de derivados da heparina em arritmias induzidas eletricamente no átrio direito de rato" para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Os membros da banca consideram a candidata:

Conceito

Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy

Dr. Ivame Luis dos Santos Tersariol

Dr. Afonso Caricati Neto

APROVADA
APROVADA
APROVADA


Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy
Universidade de Moji das Cruzes


Prof. Dr. Ivame Luis dos Santos Tersariol
Universidade de Moji das Cruzes


Dr. Afonso Caricati Neto
Universidade Federal de São Paulo

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus por ser minha
fortaleza nos momentos mais difíceis,
e a minha mãe, Neusa pelo apoio
permanente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, por me guiar e me dar força a cada dificuldade.

De maneira especial, agradeço ao *Prof. Dr. Afonso Caricati Neto*, quem assumiu a tarefa de orientador, cumprindo-a com eficácia e dedicação. Agradeço pela confiança e paciência.

Ao *Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy*, por seu apoio e ensinamento em todo o desenvolver do trabalho. Sempre com ética, dedicação, cumplicidade e amizade. Agradeço pela confiança e paciência.

Aos meus pais, *Gilberto e Neusa*, por me darem oportunidade de estudar e chegar onde eu cheguei.

Ao *Felipe César, minha irmã Adriana e a minha prima Renata de Paula*, por estar ao meu lado me apoiando sempre que precisei.

Também agradeço aos amigos e colegas de laboratório pela troca de experiências, sugestões e ajuda: *Gustavo, Tatiana, Marília, Ênio, Ivan*.

Ao *Prof. Dr Ivarne Luís dos Santos Tersariol*, pela colaboração.

Aos professores do programa de Engenharia Biomédica pelos ensinamentos.

Aos colegas do NPT (Núcleo de Pesquisas Tecnológicas).

A *Fabiane* pela sua amizade e eficiência.

A *Teresinha* por seu carinho.

A *Adriessa e Douglas* por cuidarem do biotério com muita dedicação.

RESUMO

Estudamos os efeitos dos fragmentos de heparina em arritmias induzidas por eletroestimulação em átrio direito isolado de ratos e ainda propusemos fundamentar o estudo envolvendo a ação da Enoxaparina sobre o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TNC) no que se refere à indução de arritmia por meio do bloqueio farmacológico do TNC, bem como a alteração da força do átrio esquerdo isolado de rato na presença da Enoxaparina, pela análise do seu pico. Os fragmentos de heparina foram adicionados na solução de perfusão de cada átrio. Usamos trens de pulso de 250 pulsos bipolares de tensão, 67 hertz para indução, considerando a amplitude de estímulo como o indicador da inducibilidade. Para a análise da força foi utilizado uma frequência de 2 hertz, com amplitude de estímulo e 2X o limiar atrial. A partir dos registros obtidos, medimos os picos da força de contração e a cinética de relaxamento da fibra muscular nas condições de ausência ou presença da Enoxaparina. A eficácia antiarrítmica máxima da Ardeparina e Nadroparina ocorreu, respectivamente, em concentrações (μM): 30 μM e 50 μM . A concentração mínima para o efeito do fragmento de heparina era inversamente proporcional ao seu peso molecular. A queda da força do átrio esquerdo é potencializada no momento da aplicação da Enoxaparina na solução de perfusão e a curva de decaimento, no que se refere ao relaxamento da fibra muscular cardíaca, passa a estar acelerada em relação ao grupo controle (ausência do fármaco). Concluímos que alguns fragmentos de heparina têm o efeito antiarrítmico, e que a eficácia dos fragmentos depende do tamanho de suas moléculas. Os estudos concluíram também que os fragmentos de heparina diminuem a força de contração da fibra cardíaca e acelera seu relaxamento, por acelerar a atividade do TNC.

Palavras – chave: estimulação elétrica, fragmentos de heparina, arritmias.

ABSTRACT

The effect of the fragments of heparin in induced arrhythmias for electric stimulation in isolated right forecourt of rats, had been studied in this work. To base the study involving the action of the Enoxaparin on the exchanger $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TNC) as for the induction of arrhythmia by means of the pharmaco blockade of the TNC, also was one of our proposals, as well as the alteration of the force of the isolated left forecourt of rat in the presence of the Enoxaparin, for the analysis of its peak. In the solution of perfusion of each forecourt the particles of heparin had been added. Considering the pulse strength as indicating of the inducibility, for the induction they had been used pulse trains of 250 bipolar pulses of tension and 67 hertz for induction. We use a frequency of 2 hertz, with pulse strength and 2 X the atrial threshold, for we analyze of the force. Present Enoxaparin or not, of the registers, we measure the peaks of the force of kinetic contraction and of relaxation of the muscular fiber. The maximum antiarrhythmic effectiveness of the Ardeparin and Nadroparin occurred, respectively, in concentrations (μM): $30\mu\text{M}$ and $50\mu\text{M}$. The minimum concentration for the effect of the particle of heparina inversely proportional to the molecular weight of itself. At the moment of the application of the Enoxaparin in the perfusion solution the fall of the force of the left forecourt is potenciality and the decline curve, as for the relaxation of the cardiac muscle fiber, starts to be speeded in relation to the group of control (pharmaco absence). It was concluded that some fragments of heparin have the antiarrhythmic effect, and the effectiveness of the particles depends on the size of its molecules. The studies had also concluded that fragments of heparin diminish the force of contraction of the cardiac fiber and speed up its relaxation, for speeding up the activity of the TNC.

Keywords: electric stimulation, heparins fragments, arrhythmias.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os valores correspondem a média \pm SEM de 4 ou 12 experimentos. No grupo controle foram realizados 12 experimentos e no grupo Ardeparina foram realizados 4 experimentos para cada concentração deste fármaco. A frequência natural foi registrada antes de cada arritmia. bpm = batimentos por minuto. O valor >6 indica que não foi possível induzir arritmia, mesmo aplicando mais de 6 trens de pulso.....55

Tabela 2. Os valores correspondem a média \pm SEM de 4 ou 12 experimentos. No grupo controle foram realizados 12 experimentos e no grupo Nadroparina foram realizados 4 experimentos para cada concentração deste fármaco. A frequência natural foi registrada antes de cada arritmia. bpm = batimentos por minuto. O valor >6 indica que não foi possível induzir arritmia, mesmo aplicando mais de 6 trens de pulso.....56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração das câmaras do coração de mamíferos.....	19
Figura 2.	Ilustração do tecido excito-condutor (B) do coração de mamíferos	21
Figura 3.	Gráfico ilustrando as fases do potencial de ação registrado tipicamente nos cardiomiócitos de mamíferos.....	24
Figura 4.	Modelo ilustrando os mecanismos envolvidos na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiocitos.....	27
Figura 5.	Modelo ilustrando a participação do trocador Na^+/Ca^{2+} (TNC ou NCX) na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiocitos.....	31
Figura 6.	Ilustração de um modelo de circuitos ou correntes reentrantes no tecido cardíaco.....	33
Figura 7:	Efeito dos agentes antiarrítmicos sobre as diferentes fases do potencial e ação cardíaco.....	35
Figura 8.	Estrutura Química da molécula de Heparina e de alguns fragmentos derivados da heparina (Modificado de Dietrich e cols., 1999).....	39
Figura 9.	Foto ilustrando a montagem experimental utilizada para átrio isolado.....	46
Figura 10.	Gráfico ilustrando o número de trens mínimos e máximos necessários para indução de arritmia em função da amplitude de estímulo do trem(expresso com múltiplo do limiar atrial, LA).....	50
Figura 11.	Ilustração mostrando o perfil da contração isométrica do átrio.....	52
Figura 12.	Eletrograma típico mostrando o efeito da Ardeparina 30 μ M e Nadroparina 50 μ M em átrio direito isolado de rato submetido á EET. Notar a freqüência atrial obtida antes e após a EET (linhas verticais no meio do registro).....	54
Figura 13.	Curva concentração-efeito dos fragmentos derivados da heparina.....	58
Figura 14.	Histograma mostrando a relação entre a concentração mínima para indução do efeito antiarrítmico máximo e o peso molecular dos derivados de heparina.....	60
Figura 15.	Eletrograma típico obtido em átrio direito isolado de rato submetido á EET, na ausência (controle) e na presença de Enoxaparina ou KB-R7943 ou de Enoxaparina + KB-R7943.....	61

Figura 16. Histogramas mostrando a amplitude de estímulo necessária para a tentativa indução de arritmia em atrio direito de rato, na ausência (controle) e na presença de KB-R 7943 50µM, Enoxaparina 100µM ou KB-R 7943 50µM + Enoxaparina 100µM.....63

Figura 17. Histograma mostrando o número de trens de pulsos necessários para indução de arritmia em átrio direito de rato, na ausência (controle) e na presença de KB-R 7943 50µM, Enoxaparina 100µM ou KB-R 7943 50µM + Enoxaparina.....64

Figura 18. Grafico mostrando o efeito da Enoxaparina 100µM sobre a força de contração do átrio esquerdo de rato. Notar que a Enoxaparina reduziu a força de contração atrial.....66

Figura 19. Gráfico mostrando o efeito da Enoxaparina 100µM sobre o decaimento da força de contração do átrio esquerdo de rato. Notar que a Enoxaparina acelerou o decaimento da força de contração atrial.....67

LISTA DE ABREVIACOES

Ca ²⁺	Íons Cálcio
Na ⁺	Íons Sódio
K ⁺	Íons Potássio
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
VDCC	Canais de Ca ²⁺ voltagem-dependentes
RyR	Receptor de Rianodina
SER	Retículo endo-sarcoplasmático
MUC	Uniporter Mitocondrial de Ca ²⁺
NCX	Trocadores Na ⁺ /Ca ²⁺
DCV	Disfunção Cardfica
NPT	Núcleo de Pesquisas Tecnológicas
UMC	Universidade de Mogi das Cruzes
CIIB	Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica
UNIFESP	Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São –
EPM	Escola Paulista de Medicina
EET	Estimulação Elétrica Transmural
ARDE	Ardeparina
NADRO	Nadroparina
ENOX	Enoxaparina
SA	Nodo Sino-Atrial ou Sinusal
AV	Nodo trio-Ventricular
PA	Potencial de Ação
I _K	Corrente de K ⁺
mV	Milivolts
CICR	Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ -release
MITO	Mitocôndria
kDa	Kilodltons
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
KH	Krebs Heinsleit

FC	Frequência Cardíaca
μM	Micromolar
LA	Limiar Atrial
AD	Átrio Direito
AENIA	Amplitude da EET Necessária para a Indução das Arritmias Atriais
s	Segundos
bpm	Batimentos por Minuto
CCE	Concentração-Efeito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 AS BASES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO CORAÇÃO.....	17
1.1.1 O Átrio Direito e seu papel na Regulação do Ritmo Cardíaco.....	18
1.1.2 A Atividade Elétrica do Coração e o seu Papel na Contração Cardíaca.....	20
1.1.3 O Papel do Ca^{2+} na Regulação da Função Cardíaca.....	25
1.1.4 O Papel do Trocador Na^+/Ca^{2+} na Homeostase do Ca^{2+} na Células Cardíacas.....	29
1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DAS ARRITMIAS CARDÍACAS.....	30
1.3 OS DERIVADOS DA HEPARINA E SUAS AÇÕES CARDIOVASCULARES.....	36
2 OBJETIVOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Animais.....	42
3.2 Solução Fisiológica.....	42
3.3 Preparação do Átrio para os Experimentos de Indução de Arritmia.....	42
3.4 Protocolo Experimental de Indução de Arritmias Cardíacas.....	43
3.5 Parâmetros Avaliados.....	44
3.6 Fármacos.....	46
3.7 Protocolos Experimentais.....	46
3.8 Protocolo de Indução de Arritmias Atriais.....	47
3.9 Registro da força de contração para o estudo dos efeitos dos derivados de heparina sobre o inotropismo atrial.....	50
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Caracterização do Modelo de Arritmias Atriais.....	52
4.2 Efeito dos Derivados de Heparina nas Arritmias Atriais.....	52
4.3 Estudos Quantitativos do Efeito Inibitório dos Derivados da Heparina nas Arritmias Atriais.....	56
4.3.1 Relação entre o efeito antiarritmico e a concentração dos derivados de heparina.....	56
4.3.2 Relação entre o efeito antiarritmico e o peso molecular dos derivados de heparina.....	58
4.4 Efeito do Bloqueio do Trocador Na^+/Ca^{2+} sobre a Ação Anti-arritmica dos Derivados da Heparina.....	58
4.4.1 Efeito do Bloqueio do Trocador Na^+/Ca^{2+} sobre a amplitude de estímulo necessário para indução de arritmias atriais.....	61
4.4.2 Efeito do Bloqueio do Trocador Na^+/Ca^{2+} sobre o número de trens de pulsos necessários para indução de arritmia atriais	61
4.5 Efeito dos Derivados de Heparina sobre a força de contração e o relaxamento atrial.....	64

5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV), incluindo as arritmias cardíacas, são responsáveis por cerca de 17,5 milhões de mortes anuais em todo mundo, sendo que 80% dessas mortes ocorrem em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Embora os estudos fisiopatológicos tenham demonstrado que as arritmias cardíacas são causadas por alterações na gênese e/ou na condução da atividade elétrica do coração (Boyden, 1996), os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas arritmias cardíacas permanecem sob investigação. Inúmeros estudos têm demonstrado que os íons Ca^{2+} desempenham um papel crucial na função cardíaca e alterações da homeostase do Ca^{2+} nos cardiomiócitos poderiam estar diretamente envolvidas na fisiopatologia das arritmias cardíacas (vide revisão de Kranias & Bers, 2007). Portanto, o estudo do papel preciso do Ca^{2+} nas arritmias cardíacas poderia contribuir decisivamente para o avanço do conhecimento na fisiopatologia e no tratamento farmacológico das arritmias cardíacas.

Inúmeros estudos experimentais demonstraram que as respostas contráteis dos cardiomiócitos são desencadeadas por aumentos transientes da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (vide revisão de Bers, 2002). Este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resulta primariamente do influxo de Ca^{2+} resultante da abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (VVDC) tipo L plasmalemais estimulada pela despolarização da membrana plasmática dos cardiomiócitos (vide revisão de Bers, 2002). O Ca^{2+} que flui através dos VVDC tipo L ativa os canais de liberação de Ca^{2+} regulados pelos receptores sensíveis á rianodina (RyR) localizados nas membranas do retículo endo/sarcoplasmático (SER) (vide revisão de Bers, 2002). A abertura dos canais de Ca^{2+} acoplados aos RyR promove a liberação de Ca^{2+} do SER, aumentando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e este evento desencadeia uma série de reações bioquímicas intracelulares que produzem ativação das proteínas contráteis, encurtamento dos cardiomiócitos e geração de força muscular (Bers, 2000).

A elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos ativa sistemas celulares capazes de promover o restabelecimento dos níveis citosólicos basais de Ca^{2+} , permitindo que estas células retornem ao estado de repouso (relaxamento) e tornem-se novamente excitáveis formando um ciclo contínuo de contração e relaxamento (Bers, 2000). Os níveis citosólicos basais de Ca^{2+} são reestabelecidos pela captação de Ca^{2+} mediado por Ca^{2+} -ATPases do SER (SERCA) e uniporter mitocondrial de Ca^{2+} (MUC) e pela extrusão do Ca^{2+} dos cardiomiócitos mediada pelas Ca^{2+} -ATPases (PMCA) e

trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) do plasmalema (vide revisão de Bers, 2002, 2005 e 2008). Vários estudos sugerem que o NCX constitui um dos principais sistemas de redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos (Bers, 2002 e 2008).

O ajuste preciso da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos é fundamental para o disparo regular dos impulsos elétricos que controlam o mecanismo de excitação-contração cardíaco (Bers, 2002 e 2008). Estudos experimentais sugerem que modificações na homeostase de Ca^{2+} nos cardiomiócitos podem alterar substancialmente a atividade elétrica do tecido cardíaco e assim gerar arritmias cardíacas (Bers, 2002, 2008 e 2009). Portanto, o entendimento preciso dos mecanismos envolvidos na homeostase do Ca^{2+} em cardiomiócitos pode contribuir de maneira decisiva no avanço do conhecimento das bases fisiopatológicas e terapêuticas das arritmias cardíacas.

A disfunção cardíaca causados pelas arritmias cardíacas pode comprometer severamente a circulação sanguínea sistêmica e provocar a falência funcional dos órgãos internos do organismo (Guyton, 1997). Visando reduzir a morbidade e a mortalidade resultante das arritmias cardíacas, procedimentos terapêuticos são necessários para impedir o desenvolvimento desta DCV. Neste sentido, as arritmias cardíacas podem ser tratadas com fármacos capazes de lentificar os ritmos automáticos e alterar qualquer um dos quatro determinantes da descarga marca-passo espontâneo das células sinusais cardíacas (Fozzard e Arnsdorf, 1991).

O arsenal farmacológico usado no tratamento das arritmias cardíacas é formado por fármacos capazes de impedir o desenvolvimento das arritmias por aumentar o potencial diastólico máximo, reduzir a despolarização do marca-passo, alterar o limiar do potencial de ação, ou ainda aumentar a duração do potencial de ação (Fozzard e Arnsdorf, 1991). Por exemplo, o propranolol e seus análogos, como o atenolol, são usados como anti-arrítmicos por serem capazes de reduzir a despolarização do marca-passo sinusal devido ao bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos cardíacos (Priori et al, 1999). Além disso, a flecainida (bloqueador de canais de Na^+ voltagem-dependentes) e o verapamil (bloqueador dos VDCC tipo L) possuem ação anti-arrítmicas por serem capazes de alterar o limiar do potencial de ação nas células cardíacas (Priori et al, 1999). A amiodarona (bloqueador de canais de K^+) prolonga o potencial de ação nas células cardíacas produzindo efeito anti-arrítmico (Priori et al, 1999).

Embora os fármacos mencionados sejam eficazes no tratamento medicamentoso dos vários tipos de arritmias cardíacas, estes possuem vários efeitos colaterais ou tóxicos indesejáveis, como

efeito inotrópico negativo cardíaco e o efeito pró-arritmico (Priori et al, 1999). Visando a descoberta de fármacos com atividade anti-arritmica dotados de maior eficácia e seletividade de ação e ainda menor toxicidade, inúmeros fármacos vêm sendo estudados em modelos de arritmias cardíacas. Um exemplo disso é a adenosina. A adenosina é um derivado das purinas capaz de restaurar de forma rápida o ritmo cardíaco em pacientes acometidos de arritmias supraventriculares (Levine, 1988). Alguns estudos demonstraram que os efeitos anti-arrítmicos da adenosina são mediados pela ativação de P₁-purinoceptores (receptores de adenosina) existentes nas células atriais e dos nodos sinoatrial e atrioventricular (Levine, 1988). Estes receptores estão acoplados à proteína G e sua ativação estimula as correntes de K⁺ sensível à acetilcolina (K_{ACH}) resultando na diminuição do influxo de Ca²⁺ pelos VDCC tipo L e conseqüentemente o encurtamento do potencial de ação nestas células (Levine, 1988). Com base nestes estudos, a adenosina foi introduzida recentemente na terapêutica medicamentosa das arritmias supraventriculares.

Mais recentemente, alguns estudos propuseram que os fragmentos derivados da heparina, como a enoxaparina, poderiam ser úteis no tratamento da fibrilação atrial devido a sua ação antitrombótica (Kim e cols, 2003). Todavia, esses estudos não descartaram a possibilidade de que os fragmentos de heparina poderiam interferir nos mecanismos envolvidos na gênese da fibrilação atrial (Kim e cols, 2003). Na mesma época, estudos realizados em cultura de miócitos vasculares de rato por Shinjo et al. (2002) propuseram que os fragmentos derivados da heparina eram capazes de reduzir a resposta contrátil destas células mediante a diminuição da [Ca²⁺]_i. O estudo propunha pela primeira vez que este efeito seria resultante da ativação do NCX pelos derivados da heparina e conseqüente aceleração da extrusão do Ca²⁺ dos miócitos vasculares (Shinjo et al. (2002).

Assim, o bloqueio da fibrilação atrial em pacientes tratados com derivados de heparina relatado por Kim e cols. (2003) provavelmente seria decorrente do aumento da extrusão de Ca²⁺ dos cardiomiócitos mediado pela ativação do NCX pelos derivados de heparina (Shinjo e cols., 2002). Esta hipótese vem sendo testada por um grupo de pesquisadores ligados ao Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT) da UMC (Prof. Dr. Carlos Marcelo G. Godoy), Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da UMC (Prof. Dr. Ivarne Luiz S. Tersariol) e Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) (Prof. Dr. Afonso Caricati Neto).

Em 2006, como fruto dessa colaboração multidisciplinar e multi-institucional, foi publicado pela primeira vez os resultados indicando que os fragmentos de heparina são capazes de bloquear as arritmias cardíacas (Dissertação de Mestrado apresentada á UMC por Juliana Duarte em 2006). Neste estudo experimental, foi mostrado que concentrações micromolares dos fragmentos derivados da heparina, como a enoxaparina, são capazes de bloquear as arritmias induzidas por estimulação elétrica transmural (EET) em átrio direito isolado de rato. Embora os mecanismos moleculares e celulares não fossem totalmente conhecidos, este estudo seminal sugeria fortemente que os derivados de heparina eram dotados de atividade antiarrítmica.

Visando aprofundar os estudos sobre as propriedades antiarrítmicas dos fragmentos derivados da heparina, decidimos no presente estudo investigar os efeitos de 3 moléculas derivadas da heparina, a Ardeparina (ARDE), a Nadroparina (NADRO) e a Enoxaparina (ENOX), sobre as arritmias induzidas pela EET em átrio direito isolado de rato. Adicionalmente, foi estudado o efeito dos derivados da heparina sobre a força de contração e o relaxamento da musculatura atrial de rato. Para subsidiar o tema, apresentaremos á seguir as bases teóricas enfocando os diferentes aspectos sobre a função cardíaca, a fisiopatologia e farmacologia das arritmias cardíacas e as ações cardiovasculares dos fragmentos derivados da heparina.

1.1. AS BASES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO CORAÇÃO

O coração é um órgão muscular oco e que funciona como uma bomba contrátil-propulsora capaz de impulsionar o sangue que flui pelos vasos sanguíneos para os diversos territórios do organismo animal. O oxigênio e nutrientes contidos no sangue são indispensáveis para a manutenção da função e sobrevivência das células do organismo animal. Nos mamíferos, o coração é formado por musculatura cardíaca (miocárdio) de três tipos principais: músculos atriais, músculos ventriculares e fibras especializadas excitatórias e condutoras (Dangelo e Fattini, 1998). Internamente o coração é revestido endocárdio e externamente pelo epicárdio (Dangelo e Fattini, 1998). Conforme ilustrado na figura 1, o coração de mamíferos é dividido por septos em duas câmaras atriais e duas câmaras ventriculares. Os átrios estão conectados em série aos ventrículos por meio de válvulas que se abrem e se fecham em função do gradiente de pressão entre seus dois lados (Guyton, 1997).

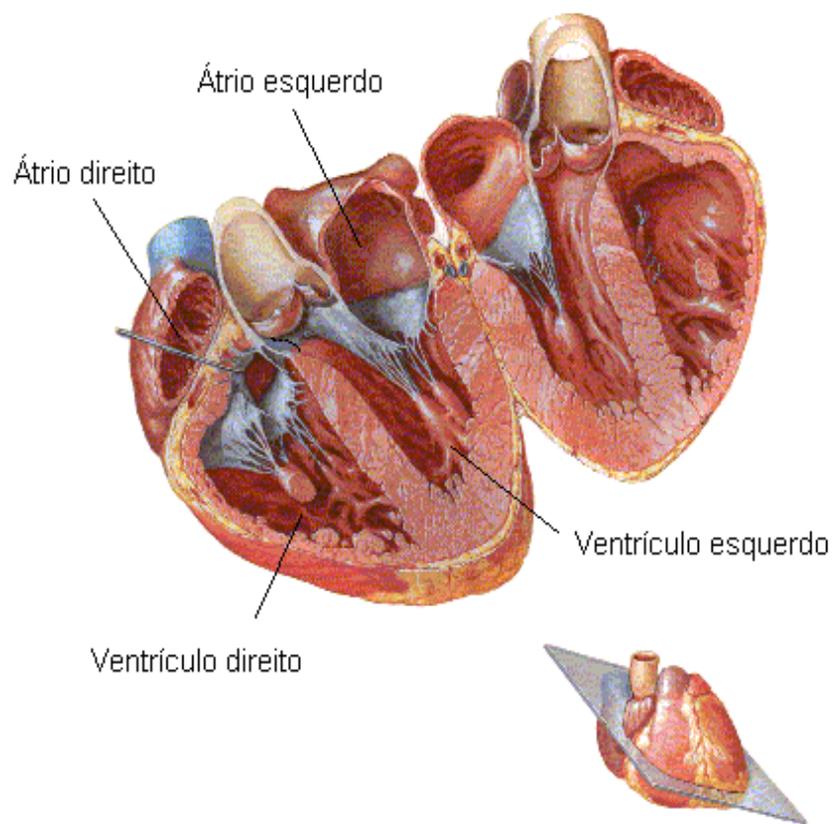
A musculatura cardíaca é dotada de um mecanismo que regula finamente o volume sanguíneo ejetado em cada ciclo cardíaco, regulando o débito cardíaco. Denominado de mecanismos de Frank-Starling, este consiste no aumento ou diminuição da força de contração em resposta ao maior ou menor estiramento do músculo cardíaco quando maiores ou menores quantidades de sangue fluem para o coração (Guyton, 1997).

A atividade mecânica (contrátil) do coração requer um padrão sequencial de excitação e contração para que ocorra uma contração rítmica e coordenada de suas câmaras atriais e ventriculares, além do funcionamento adequado de suas válvulas (Guyton, 1997). Essa atividade mecânica é disparada pela atividade elétrica gerada e conduzida no próprio tecido cardíaco (Guyton, 1997).

1.1.1. O Átrio Direito e seu papel na Regulação do Ritmo Cardíaco

No coração de mamíferos, a geração da atividade elétrica cardíaca ocorre nas células cardíacas especializadas do nodo sino-atrial ou sinusal (SA) (Cain, 1987). Desta forma, o nodo SA constitui o marca-passo natural regulador do ritmo dos batimentos cardíacos (Cain, 1987).

Anatomicamente, o nodo SA está localizado no sulco terminal da porção pósterio-superior do átrio direito na junção da veia cava superior (Cain, 1987). A figura 2 ilustra a posição anatômica do nodo SA coração humano. O tecido do nodo SA é formado por células cardíacas especializadas dotadas da capacidade de se despolarizar espontaneamente (despolarização diastólica) gerando potenciais de ação (potencial marca-passo) (Cain, 1987). Além disso, estas células são capazes de transmitir o impulso elétrico gerado para as células atriais vizinhas e outras células do tecido excito-condutor cardíaco, como as do nodo átrio-ventricular (AV) e do sistema His-Purkinje (Cain, 1987). Por sua vez, a porção terminal do tecido excito-condutor cardíaco transmite os impulsos elétricos para as demais células cardíacas, excitando-as e assim desencadeando a contração destas células miocárdicas (Cain, 1987). Os impulsos elétricos gerados no nodo SA são transmitidos por células atriais especializadas ao nodo AV, sendo que esta transmissão sofre um pequeno atraso temporal para permitir com que as câmaras ventriculares se encham de sangue (Timerman, 2000). Do nodo AV, os impulsos elétricos são transmitidos para os ventrículos através do feixe de His (Timerman, 2000).



F. Netter
©Mouartis

Figura 1. Ilustração das câmaras do coração de mamíferos. Notar que o coração apresenta 4 câmaras, sendo 2 átrios (direito e esquerdo) e 2 ventrículos (direito e esquerdo) (Modificado de Netter, 1992).

Este se divide em dois ramos (direito e esquerdo) que se dirigem para o ápice do coração através de ramos terminais finos das fibras de Purkinje, estimulando a resposta contrátil dos cardiomiócitos ventrículos no sentido ápice-base do coração. O conjunto dessas estruturas anatômicas envolvidas na geração e condução dos impulsos elétricos no coração constitui o sistema excito-condutor cardíaco (Timerman, 2000). A figura 2 mostra a disposição anatômica do sistema excito-condutor e os registros dos potenciais elétricos captados nas diferentes regiões do coração. Em seguida abordaremos os principais aspectos relativos á atividade elétrica do coração.

1.1.2. A Atividade Elétrica do Coração e o seu Papel na Contração Cardíaca

A importância dos fenômenos elétricos para o desencadeamento da contração cardíaca foi inicialmente descoberta por Galvani e Volta no século XIX (Saffitz *et al.*, 1995). Atualmente, é sabido que em um ciclo cardíaco normal, o nodo SA dispara espontaneamente impulsos elétricos, que são conduzidos para os átrios, promovendo a sístole atrial (evento correspondente á onda P do eletrocardiograma mostrado na figura 2) (Saffitz *et al.*, 1995). Ao atingir o nodo AV, os impulsos têm sua velocidade de condução reduzida permitindo que o sangue ejetado pelos átrios flua para os ventrículos (Saffitz *et al.*, 1995). Em seguida, os impulsos são transmitidos para o sistema de condução ventricular formado pelo feixe de His e as fibras de Purkinje, produzindo a sístole ventricular (evento correspondente ao complexo QRS do eletrocardiograma mostrado na figura 2) (Irisawa *et al.*, 1993; Noma, 1996). A repolarização atrial (ocorrida juntamente com o complexo QRS do eletrocardiograma mostrado na figura 2) e a repolarização ventricular (evento correspondente á onda T do eletrocardiograma mostrado na figura 2) completam o ciclo cardíaco (Irisawa *et al.*, 1993; Noma, 1996).

Na espécie humana e em condições fisiológicas, os átrios contraem-se cerca de 1/6 de segundo antes dos ventrículos, permitindo o enchimento adicional desses ventrículos antes do bombeando do sangue para os pulmões e circulação sistêmica (Irisawa *et al.*, 1993; Noma, 1996). Outra importância especial desse sistema refere-se ao fato de que as porções dos ventrículos se contraíam de modo quase simultâneo, sendo que este evento é essencial para a geração efetiva de pressão nas câmaras ventriculares (Irisawa *et al.*, 1993; Noma, 1996).

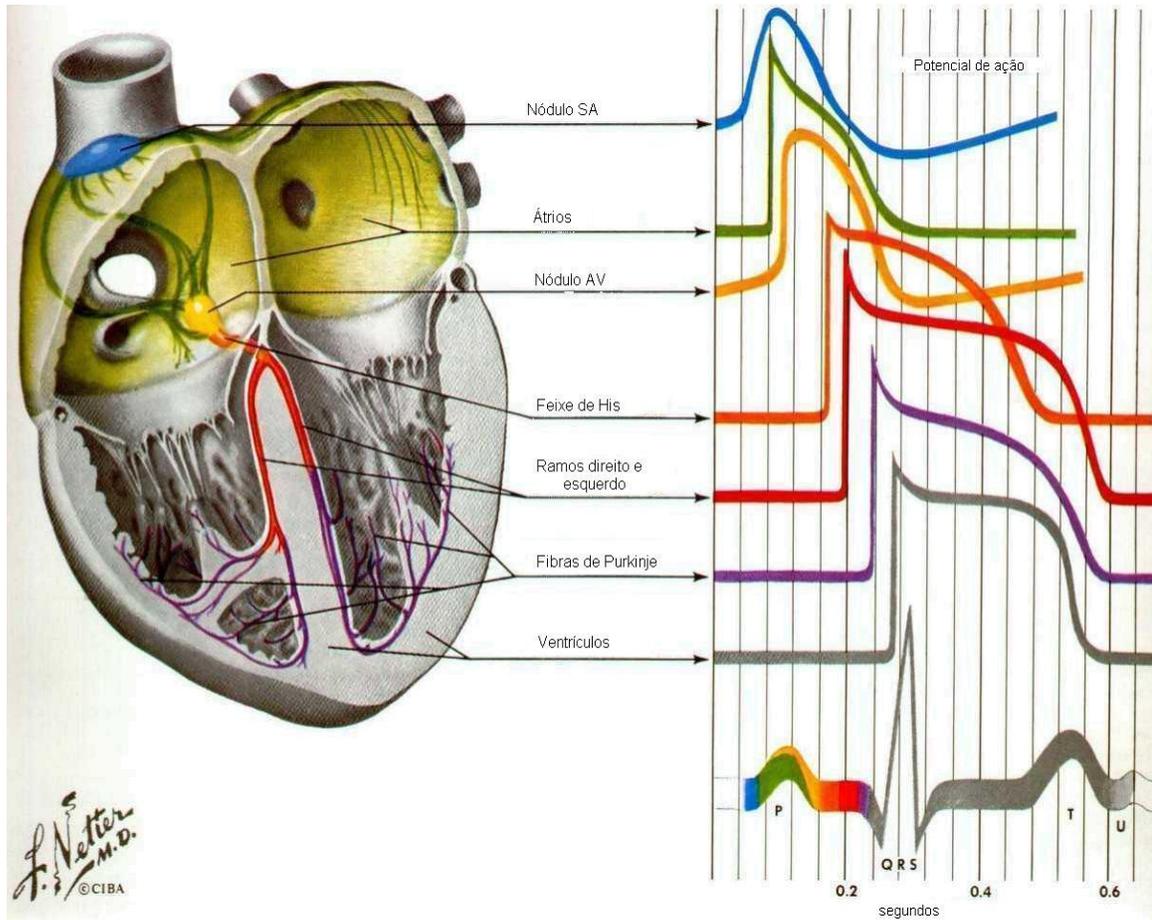


Figura 2. Ilustração do tecido excito-condutor (B) do coração de mamíferos. O painel da esquerda mostra a disposição anatômica do tecido excito-condutor cardíaco. O painel da direita mostra o registro típico dos potenciais elétricos captados nas diferentes regiões cardíacas e o seu decurso temporal. A parte inferior do painel da direita mostra o registro típico do eletrocardiograma (Modificado de Netter, 1992).

A função contrátil do miocárdio é determinada por propriedades fundamentais do tecido cardíaco, dentre elas destaca-se a: (1) capacidade de gerar espontaneamente e ritmicamente a atividade elétrica determinando a frequência dos batimentos cardíacos (auto-ritimicidade), (2) capacidade de responder aos estímulos elétricos naturais ou artificiais (excitabilidade), (3) capacidade de conduzir o estímulo elétrico gerado pelo próprio tecido cardíaco ou por eletroestimulação (condutividade) e (4) capacidade de contrair-se em resposta à ativação elétrica ou química (contratilidade) (Irisawa *et al.*, 1993; Noma, 1996).

O fenômeno bioelétrico que promove a geração e transmissão do impulso elétrico cardíaco é o chamado potencial de ação (PA). O PA é a resposta que as células ou os tecidos apresentam quando os mesmos são estimulados naturalmente ou artificialmente (Lamas *et al.*, 2002). Assim, ao ser estimulada com intensidade superior ao seu limiar de excitabilidade, a membrana das células excitáveis altera sua permeabilidade, principalmente aos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Essas alterações ocorrem devido à abertura, fechamento e inativação de canais iônicos específicos para os íons citados e, em consequência, ocorrem diversas correntes iônicas que são responsáveis pelas cinco fases típicas do PA: fase 0 ou fase de despolarização rápida da membrana, fase 1 ou fase de repolarização parcial da membrana, fase 2 ou fase de platô do PA, fase 3 ou fase de repolarização da membrana e fase 4 ou fase de potencial de marca-passo (Lamas *et al.*, 2002).

A fase 0, caracterizada pela despolarização rápida da membrana, ocorre quando o potencial transmembrânico (V_m) atinge um limiar de disparo crítico (cerca de -60 mV), desencadeando uma corrente de entrada de Na^+ mediada por canais de Na^+ voltagem-dependentes que torna-se grande o suficiente para produzir uma despolarização regenerativa (“tudo-ou-nada”). A ativação dos canais de Na^+ pela despolarização da membrana é transitória, e se a membrana permanecer despolarizada por mais de alguns milissegundos, esses canais fecham-se novamente (inativação). Por conseguinte, estes canais encontram-se fechados durante o platô do PA e permanecem inacessíveis para o início de outro PA até que a repolarização da membrana. A fase 1 caracteriza-se por uma repolarização transitória da célula cardíaca devido a inativação dos canais de Na^+ . A fase 2 (platô) caracteriza-se pela ocorrência de uma corrente despolarizante de Ca^{2+} mediada pelos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (VDCC) de ativação

lenta. A fase 3 caracteriza-se por uma repolarização da célula cardíaca decorrente do efluxo de K^+ mediado por canais de K^+ e da redução do influxo de Ca^{2+} devido a inativação dos VDCC.

A fase 4 caracteriza-se por uma despolarização gradual durante a diástole. A atividade de marca-passo normalmente é encontrada em tecido nodal e de condução. O potencial de marca-passo é causado por uma combinação do aumento das correntes de entrada com o declínio das correntes de saída durante a sístole. Geralmente, este potencial é mais rápido nas células do nodo sinusal e portanto atua como marca-passo para o coração inteiro. As células do nodo sinusal têm uma condutância basal maior para o Na^+ do que os miócitos atriais ou ventriculares, levando a maior corrente basal de entrada. Ademais, a inativação dos VDCC gradualmente diminui durante a diástole, resultando em uma crescente corrente de entrada de Ca^{2+} no período final da diástole. A ativação dos VDCC do tipo T durante a fase final da diástole contribui para atividade de marca-passo do nodo sinusal. O potencial de membrana negativo na diástole ativa canais de cátions permeáveis ao Na^+ e ao K^+ , dando origem a mais uma corrente de entrada denominada I_f . Várias correntes de saída voltagem-dependentes desempenham, também, um papel importante neste processo, dentre estas a corrente de K^+ retificadora tardia (I_K), a qual é ativada durante o PA, é desativada pelo potencial de membrana negativo no início da diástole. A corrente originada pela bomba eletrogênica de Na^+/K^+ também contribui para a corrente de saída durante o potencial de marca-passo. A figura 3 ilustra os registros das fases do potencial de ação e dos fluxos iônicos detectados nas células miocárdicas.

O PA ao ser deflagrado se propaga de uma célula para outra por meio dos “circuitos locais”. Estes circuitos resultam da corrente iônica que ocorre durante o PA entre as áreas da membrana celular que estão se despolarizando e aquelas que estão polarizadas. Esse processo de condução passa mais facilmente de uma célula cardíaca para outra por meio de “gap junctions”. Estas estruturas apresentam baixa resistência elétrica e estão localizadas nas extremidades dos miócitos cardíacos (Saffitz *et al.*, 1995).

O automatismo pode ser influenciado pelo sistema nervoso autonômico com liberação dos neurotransmissores dos nervos simpáticos (noradrenalina) e parassimpáticos (acetilcolina) que inervam das células cardíacas (Fozzard e Arnsdorf, 1991). Esses neurotransmissores modulam as correntes i_{Na} , i_K e i_{Ca} controlando a frequência de disparo do PA no nodo sinusal (Irisawa *et al.*, 1993).

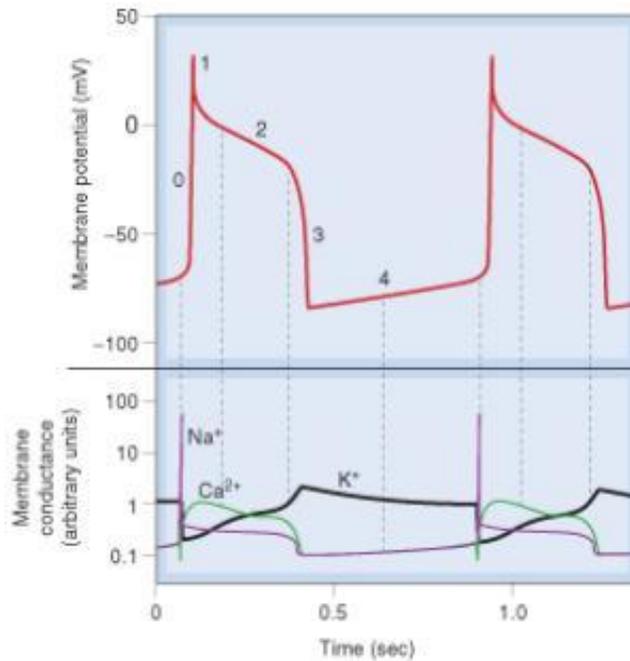


Figura 3. Gráfico ilustrando as fases do potencial de ação registrado tipicamente nos cardiomiócitos de mamíferos. A fase 0 (despolarização rápida da membrana) ocorre quando o potencial transmembrânico atinge um limiar de disparo crítico (cerca de -60 mV), desencadeando uma corrente de entrada de Na^+ mediada por canais de Na^+ voltagem-dependentes que torna-se grande o suficiente para produzir uma despolarização regenerativa (“tudo-ou-nada”). A fase 1 (repolarização parcial da membrana) ocorre devido a repolarização transitória da célula cardíaca resultante da inativação dos canais de Na^+ . A fase 2 (platô do potencial de ação) ocorre devido a corrente despolarizante de Ca^{2+} mediada pelos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (VDCC) de ativação lenta. A fase 3 (repolarização da membrana) ocorre quando a membrana da célula cardíaca sofre repolarização devido ao efluxo de K^+ (ativação de canais de K^+) e da redução do influxo de Ca^{2+} (inativação dos VDCC). A fase 4 (potencial marca-passo) ocorre quando a membrana da célula cardíaca sofre uma despolarização gradual durante a diástole. A atividade de marca-passo normalmente é encontrada em tecido nodal e de condução. O potencial de marca-passo é causado por uma combinação do aumento das correntes de entrada com o declínio das correntes de saída durante a sístole. (Modificado de Rang & Dale, 2007).

O término da contração e a instalação do estado de repouso das células cardíacas é determinado pela redução da $[Ca^{2+}]_i$ para os níveis basais capazes de levar as células ao relaxamento (Bers, 2002). Esta redução da $[Ca^{2+}]_i$ é mediada por sistemas celulares especializados no transporte de Ca^{2+} para o interior de organelas citoplasmáticas (seqüestração de Ca^{2+}) ou para o meio extracelular (extrusão de Ca^{2+}) (Bers, 2002). Em seguida, abordaremos de forma mais detalhada o papel do Ca^{2+} na função cardíaca e os mecanismos envolvidos na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ nas células cardíacas.

1.1.3. O Papel do Ca^{2+} na Regulação da Função Cardíaca

A importância do Ca^{2+} para a contração muscular foi demonstrada pelos estudos experimentais realizados por Ringer no século XIX (Goodman & Gilman, 2007). Ao longo de vários anos foi demonstrado que o Ca^{2+} desempenha um papel fundamental na sinalização celular participando de vários processos celulares, como a contração, regulação da excitabilidade celular, secreção de hormônios e neurotransmissores, respiração mitocondrial, divisão e proliferação celular, transcrição genética, morte celular e outros (Bers, 2002).

A ligação do Ca^{2+} em sítios específicos da troponina C constitui o evento decisivo no desencadeamento do processo contrátil nas células cardíacas (Roos, 1997). A troponina C é uma proteína contrátil presente nos filamentos finos do sarcômero dos músculos cardíacos (Roos, 1997). A ligação do Ca^{2+} na troponina C é essencial para que ocorra a interação entre os filamentos contráteis de actina e a miosina (Roos, 1997). Portanto, o desenvolvimento de força e o encurtamento dos cardiomiócitos é um processo celular dependente de Ca^{2+} (Roos, 1997).

Na diástole, a ocupação dos sítios específicos de ligação do Ca^{2+} na troponina C é muito pequena devido à baixa $[Ca^{2+}]_i$ (Roos, 1997). Portanto, para que a contração ocorra, é necessário que a $[Ca^{2+}]_i$ seja aumentada (Roos, 1997). A ativação elétrica do miócito (potencial de ação) funciona como o "gatilho" para a sinalização celular envolvida na contração (Roos, 1997). O sinal que atua como o elo de ligação entre o potencial de ação e a atividade contrátil mediado pela elevação da $[Ca^{2+}]_i$ (Roos, 1997).

Na diástole, a $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos é cerca de 1000 a 10.000 vezes menor do que no meio extracelular e o sarcolema apresenta baixa permeabilidade ao Ca^{2+} (Bers, 2002). No entanto, a despolarização do sarcolema durante o potencial de ação cardíaco resulta na abertura

de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (CCVD) sarcolemais, especialmente os do tipo L, os quais são ativados por potenciais de +30 mV (Bers, 2002). Quando ativados, esses canais medeiam correntes despolarizantes de Ca^{2+} , que contribuem para a manutenção da fase de platô do PA nas células ventriculares, bem como para a fase de despolarização do PA nas células marca-passo do nodo sinusal (Bers, 2001, 2002).

Em cardiomiocitos de mamíferos, o influxo de Ca^{2+} através dos VDCC tipo L é responsável por cerca de 10% a 15% do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bers 2001, 2002). Apesar desta modesta contribuição para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante os batimentos cardíacos, o Ca^{2+} que flui para o meio intracelular pelos CCVD tipo L é capaz de liberar Ca^{2+} do SER (Bers, 2002). O SER constitui um dos mais importantes reservatórios de armazenamento de Ca^{2+} nas células miocárdicas (Bers, 2001, 2002). O SER tem em sua membrana canais de Ca^{2+} controlados por receptores sensíveis à rianodina (RyR) (Bers, 2001, 2002). A ativação desses canais pelo Ca^{2+} induz a liberação de Ca^{2+} do SER para o citosol. Este mecanismo de amplificação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, denominado de " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release" (CICR), produz um aumento transiente da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ capaz de estimular a troponina C e gerar o deslizamento dos filamentos de actina e miosina, resultando na contração dos cardiomiócitos (Bers, 2001, 2002).

Os VDCC tipo L existentes no sarcolema de cardiomiócitos estão localizados muito próximos aos canais controlados pelos RyR do SER (Bers 2001, 2002). Esta co-localização confere um acesso rápido do Ca^{2+} que adentra a célula através dos CCVD tipo L. A figura 4 mostra um modelo dos mecanismos envolvidos na regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiocitos.

A existência do CICR nas células excitáveis de mamíferos e sua importância no desencadeamento da contração dos cardiomiócitos foi descoberta por Fabiato e cols, na década de 1980 (Fabiato, 1983). Utilizando células tratadas com agentes permeabilizantes de membrana para facilitar o ingresso do Ca^{2+} na célula, Fabiato e cols mostraram que o Ca^{2+} induz a liberação de Ca^{2+} do SER, amplificando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fabiato, 1983). Fisiologicamente, esta liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (" Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release" ou CICR) é desencadeada pela liberação de Ca^{2+} do SER através de canais de Ca^{2+} controlados pelos RyR ativados pelo Ca^{2+} que ingressa na célula através de VDCC tipo L ativados durante o potencial de ação (Bers, 2002).

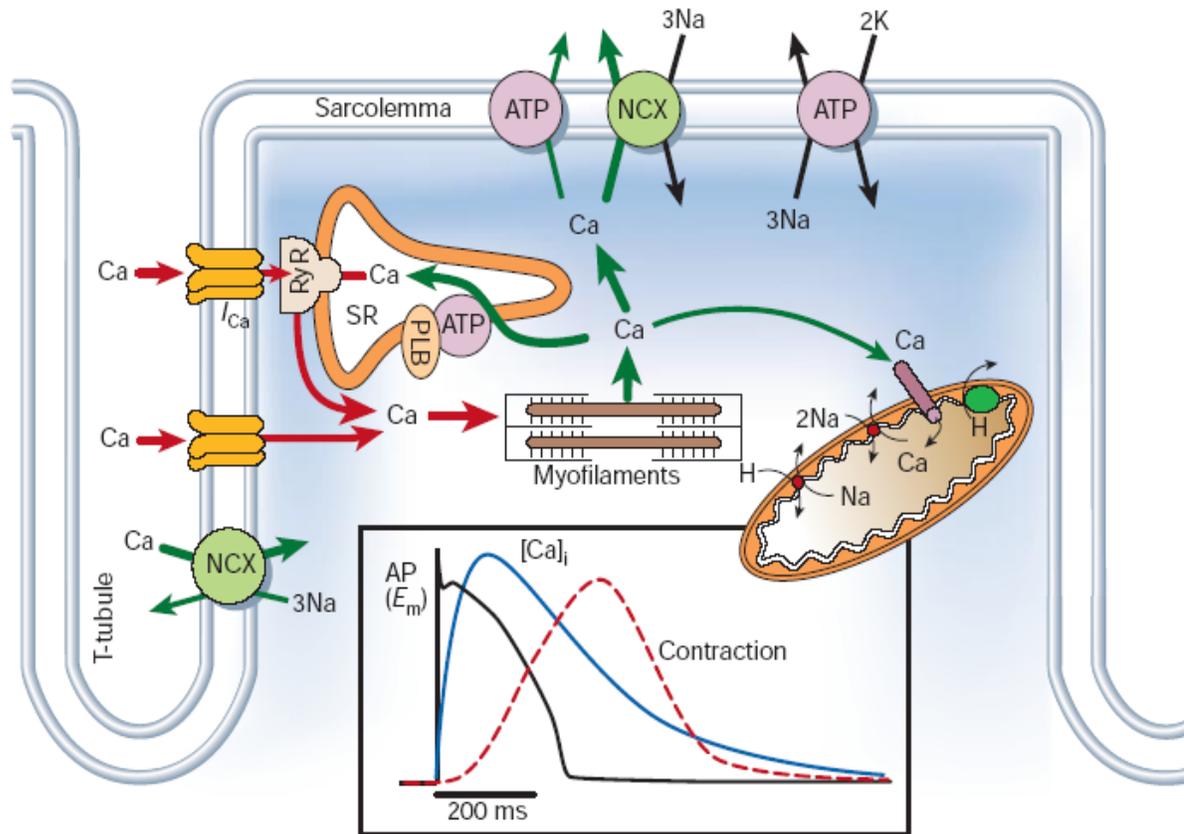


Figura 4 : Modelo ilustrando os mecanismos envolvidos na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos. Notar que o Ca^{2+} que flui para o meio intracelular pelos CCVD tipo L é capaz de liberar Ca^{2+} do SER por meio da ativação de canais de Ca^{2+} controlados por receptores sensíveis á rianodina (RyR). A ativação desses canais pelo Ca^{2+} induz a liberação de Ca^{2+} do SER para o citossol. Este mecanismo de amplificação da $[Ca^{2+}]_i$, denominado de " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release" (CICR), produz um aumento transiente da $[Ca^{2+}]_i$ capaz de estimular a troponina C e gerar o deslizamento dos filamentos de actina e miosina, resultando na contração dos cardiomiócitos. SL – sarcolema; RS - retículo sarcoplasmático; MITO - mitocôndria; NCX - trocador Na^+/Ca^{2+} ; I_{Ca} - corrente de Ca^{2+} mediada por meio de VDCC tipo L; MF-miofilamentos contráteis. (Modificado de Bers, 2002)

O Ca^{2+} liberado do SER se difunde no citossol causando um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que pode atingir valores de pico da ordem de $1\mu\text{M}$ (Bers, 2002). Esta elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta a interação do Ca^{2+} com a troponina C e ativação dos miofilamentos contráteis de actina e miosina, desencadeando a contração (Bers, 2002).

O NCX é um mecanismo de contra-transporte que pode transportar Ca^{2+} em ambos os sentidos (efluxo, modo direto; e influxo, modo reverso), dependendo do potencial de membrana e dos gradientes transmembrânicos de Na^+ e Ca^{2+} (Blaustein et al., 1999). Em condições fisiológicas, no entanto, o transporte de Ca^{2+} para o citossol mediado pelo NCX (operando em modo reverso) não parece ser importante para o acoplamento excitação-contração fisiológico (Blaustein et al., 1999).

A redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para os níveis basais constitui um evento determinante para o término da contração e a instalação do estado de repouso das células cardíacas, levando as células ao relaxamento (Bers, 2002). Na maioria das células excitáveis, a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é mediada por sistemas celulares especializados no transporte de Ca^{2+} para o interior de organelas citoplasmáticas (seqüestração de Ca^{2+}) ou para o meio extracelular (extrusão de Ca^{2+}) (Bers, 2002). Estes sistemas celulares de transporte de Ca^{2+} são formados principalmente pelas Ca^{2+} -ATPases das membranas do retículo endo/sarcoplasmático (SERCA), pelos uniporters de Ca^{2+} das membranas mitocôndrias (MUC), pelas Ca^{2+} -ATPases da membrana plasmática (PCMA) e pelos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) da membrana plasmática (Bers, 2002). Em seguida, abordaremos de forma mais detalhada o papel do Ca^{2+} na função cardíaca e os mecanismos envolvidos na regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células cardíacas.

Por outro lado, o relaxamento miocárdico requer que o Ca^{2+} se dissocie de seus sítios de ligação na troponina C (Bers, 2002). Este evento ocorre quando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ retorna aos níveis basais, como aqueles detectados na diástole. No cardiomiócitos, as proteínas transportadoras de Ca^{2+} transportam o Ca^{2+} livre existente no citossol para compartimentos intracelulares ou para o meio extracelular (Bers, 2002). O relaxamento dos cardiomiócitos de mamíferos depende principalmente da captação de Ca^{2+} pelo SER por meio da atividade da SERCA (Bers, 2002). Este mecanismo é responsável por cerca de 70% a 90% do Ca^{2+} removido do citossol dos cardiomiocitos (Bers, 2002). Dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento animal, o

NCX operando no modo direto (efluxo de Ca^{2+}) é responsável por cerca de 7% a 30% do Ca^{2+} removido dos citossol dos cardiomiocitos (Bassani, 2002, Bers 2002).

Outros sistemas de seqüestração e extrusão de Ca^{2+} , como aqueles mediados pela PCMA e MCU, também contribuem para a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiocitos (Bers, 2002). Porém, em condições fisiológicas estes sistemas parecem desempenhar um papel minoritário no relaxamento dos cardiomiocitos (Bassani, 1999, Bers 2002).

1.1.4. O Papel do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na Homeostase do Ca^{2+} nas Células Cardíacas

Como mencionado anteriormente, o relaxamento dos cardiomiocitos resulta da diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e conseqüentemente da dissociação do Ca^{2+} dos miofilamentos contráteis (Bers, 2002). A diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiocitos é mediado majoritariamente pela seqüestração de Ca^{2+} pelo SER (mediado pela SERCA) e pela extrusão de Ca^{2+} da célula (mediado pela NCX), e minoritariamente pela captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (mediado pelo MCU) e pela extrusão de Ca^{2+} da célula (mediado pela PCMA) (Bers, 2001, 2002).

A troca de íons Na^+ com íons de Ca^{2+} através da membrana plasmática é um componente essencial das vias de sinalização mediadas pelo Ca^{2+} em vários tipos de células excitáveis (Shinjo et al, 2002). O NCX é uma proteína capaz transportar Na^+ e Ca^{2+} . Apesar de atuar nas células musculares esqueléticas e lisas, a atividade deste trocador tem uma importância fisiológica fundamental nas células musculares cardíacas (Bers, 2002). Nestes músculos, o NCX é um importante regulador da contratilidade, fazendo a troca de íons, por transporte ativo secundário, ou seja, extrusão de 1 Ca^{2+} em troca de 3 Na^+ , permitindo assim, a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e, conseqüentemente, o relaxamento dos cardiomiocitos (Bers, 2002). A atividade do TNC pode ser modulada farmacologicamente. Por exemplo, concentrações micromolares de KB-R 7943 foram capazes de bloquear seletivamente o TNC em cardiomiocitos de rato (Bonazzola et al., 2002), enquanto concentrações micromolares dos fragmentos derivados da heparina foram capazes de reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cultura de células musculares lisas de rato supostamente por ativar o TNC (Shinjo e cols, 2002).

A direção do transporte de íons mediado pelo NCX é dependente do potencial de membrana e do gradiente químico para estes íons, o que, por sua vez, se correlaciona com a atividade da bomba Na^+/K^+ (Bers, 2002). Em situações de hipóxia (redução dos níveis de ATP) ou de uso de digitálicos, a atividade da bomba de Na^+/K^+ diminui, resultando no aumento da $[\text{Na}^+]_i$ (Bers, 2001). Nestas condições, o NCX transporta o excesso de Na^+ para fora da célula em troca de Ca^{2+} (modo reverso), resultando no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pimentel, 2003). É possível que o NCX, operando no modo reverso, também possa contribuir para o influxo de Ca^{2+} na célula cardíaca durante a contração (Bers, 2001). Além disso, a redução da expressão do NCX parece estar relacionada com algumas DCV, como o infarto agudo do miocárdio e a morte coronariana por excesso de íons Ca^{2+} (Bers, 2001). A figura 5 mostra um modelo da participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) na regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiocitos.

1.2. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DAS ARRITMIAS CARDÍACAS

As arritmias cardíacas são caracterizadas por alterações no ritmo cardíaco, causadas por anormalidades na atividade elétrica do coração. Estas podem ser assintomáticas ou apresentarem sintomas variáveis como: dor torácica, dispnéia, síncope e palpitação (Applegate, 2000). Estes sintomas variam de acordo com a presença ou ausência de doenças cardíacas associadas (Applegate, 2000). Elas podem ser causadas por uma geração anormal dos impulsos elétricos, que pode ser gerada no próprio nódulo sinusal ou no desenvolvimento de focos ectópicos, gerando impulsos elétricos em locais que não pertencem ao sistema normal de excitação e condução cardíaca (Applegate, 2000).

Os impulsos se propagam pelas estruturas excitáveis e ficam bloqueados nas estruturas que estão em período refratário. Esse mecanismo pode ser resultante do aumento da automaticidade das células marca-passo latentes e das células do sistema de condução ou da ocorrência de automatismo disparado pela própria ativação elétrica em células miocárdicas (Applegate, 2000). O aumento da automaticidade também pode ser resultante da estimulação dos

receptores β -adrenérgicos cardíacos (Applegate, 2000). Já o aumento do automatismo disparado pela ativação

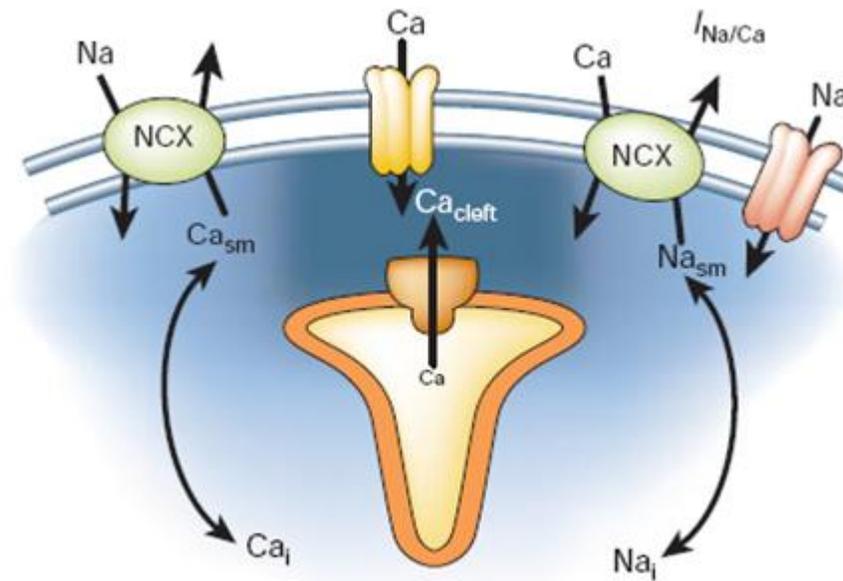


Figura 5: Modelo ilustrando a participação do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos. Notar que o Ca^{2+} que flui para o meio intracelular pelos VDCC tipo L é capaz de liberar Ca^{2+} do SER por meio da ativação de canais de Ca^{2+} controlados por receptores sensíveis á rianodina (RyR). A ativação desses canais pelo Ca^{2+} induz a liberação de Ca^{2+} do SER para o citossol. O aumento transiente da $[Ca^{2+}]_i$ ativa o NCX, estimulando a extrusão de Ca^{2+} da célula. Este evento contribui para a redução da $[Ca^{2+}]_i$ e o retorno do cardiomiócito ao seu estado de repouso (relaxamento). $Ca = Ca^{2+}$, $Na = Na^+$. (Modificado de Bers, 2002)

elétrica pode ser devido ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$, pela liberação de acetilcolina nas terminações nervosas e pelo aumento na duração do potencial de ação (Klabunde, 2007).

Do ponto de vistas dos mecanismos causadores, as arritmias cardíacas cárdicas podem ser classificadas em três categorias: (1) anormalidades na gênese da atividade elétrica, (2) anormalidades na condução da atividade elétrica e (3) anormalidades na gênese e na condução da atividade elétrica (Klabunde, 2007).

Do ponto de vista clínico, as arritmias atriais mais comuns podem ser classificados quanto sua origem em: (1) origem sinusal - taquiarritmia, bradicardia, (tendo um ritmo variável, por modificações na modulação simpática e parassimpática no nodo sinusal), (2) origem por bloqueio - formação do impulso sinusal preservada, porém a condução para os ventrículos alterada e (3) origem por circuitos reentrantes - ocorrem quando o percurso a ser percorrido pelo impulso elétrico atrial torna-se prolongado e/ou quando o tempo de condução ou o período refratário forem diminuídos, ocasionando predominantemente taquiarritmias (Klabunde, 2007).

O mecanismo de reentrada envolvido na formação dos circuitos reentrantes constitui uma desordem relacionada à condução anormal do impulso cardíaco e não à sua gênese (Veenhuyzen et al., 2004). Esta desordem ocorre quando um impulso elétrico cardíaco percorre, de maneira repetitiva, um circuito fechado de condução anormal (Veenhuyzen e cols, 2004). Este circuito de condução anormal se estabelece quando o impulso elétrico atinge um ponto de ramificação de duas vias de condução distintas, propagando-se apenas por uma delas e retornando pela outra via re-excitando novamente o ponto de ramificação. Para que isto ocorra, a via de condução que re-excita o ponto de ramificação deve exibir bloqueio unidirecional e o ponto de ramificação deve estar fora de seu período refratário. Portanto, alterações na condutibilidade e na excitabilidade cardíaca são subsídios importantes para a formação de circuitos reentrantes. A figura 6 mostra um modelo da formação dos circuitos reentrantes nas células cardíacas.

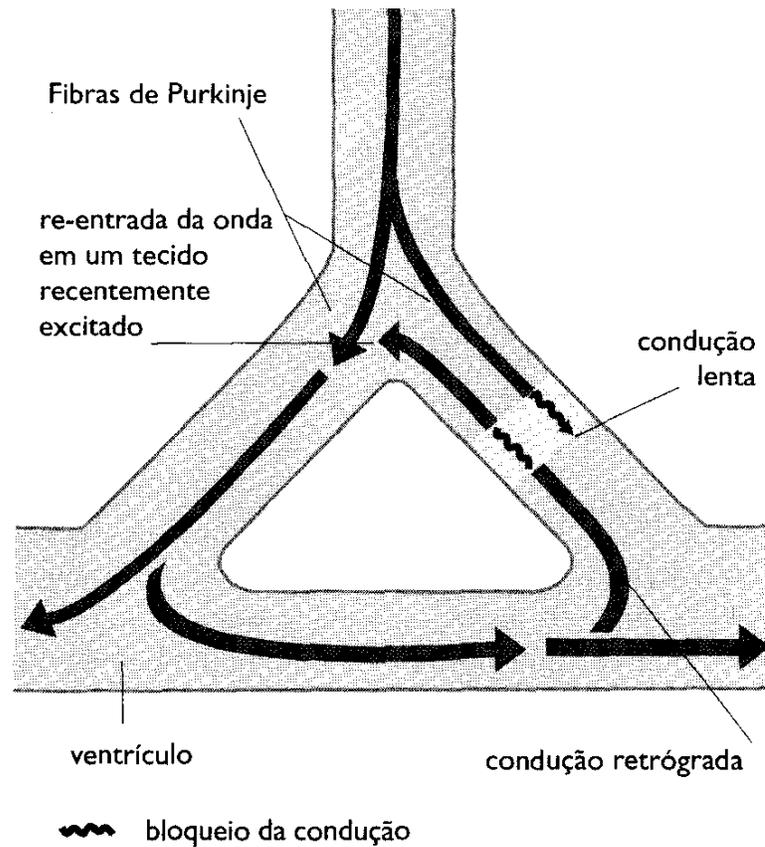


Figura 6. Ilustração de um modelo de circuitos ou correntes reentrantes no tecido cardíaco. Este circuito de condução anormal se estabelece quando o impulso elétrico atinge um ponto de ramificação de duas vias de condução distintas, propagando-se apenas por uma delas e retornando pela outra via re-excitando novamente o ponto de ramificação. Para que isto ocorra, a via de condução que re-excita o ponto de ramificação deve exibir bloqueio unidirecional e o ponto de ramificação deve estar fora de seu período refratário. A frequência da atividade reentrante é superior à normalmente mantida pelo nódulo sinusal, gerando arritmia cardíaca (Veenhuyzen e cols, 2004).

O diagnóstico preciso das arritmias cardíacas sofre grandes avanços devido ao desenvolvimento de técnicas eletrofisiológicas mais sofisticadas usando processos computacionais. Todavia, a eficácia do tratamento medicamentoso das arritmias cardíacas pode ser aumentada pela descoberta de fármacos anti-arrítmicos dotados de maior seletividade e menor toxicidade.

Atualmente, o arsenal farmacológico usado no tratamento das arritmias cardíacas é formado por fármacos capazes de impedir o desenvolvimento das arritmias por aumentar o potencial diastólico máximo, reduzir a despolarização do marca-passo, alterar o limiar do potencial de ação, ou ainda aumentar a duração do potencial de ação (Fromm et al, 1999). Por exemplo, o propranolol e seus análogos, como o atenolol, são usados como anti-arrítmicos por serem capazes de reduzir a despolarização do marca-passo sinusal devido ao bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos cardíacos (Fromm et al, 1999). Além disso, a flecainida (bloqueador de canais de Na^+ voltagem-dependentes) e o verapamil (bloqueador dos VDCC tipo L) possuem ação anti-arrítmicas por serem capazes de alterar o limiar do potencial de ação nas células cardíacas (Fromm et al, 1999). A amiodarona (bloqueador de canais de K^+) prolonga o potencial de ação nas células cardíacas produzindo efeito anti-arrítmico (Fromm et al, 1999).

A Quinidina e a Procainamida são indicadas no tratamento de taquiarritmias supraventriculares e ventriculares por produzirem bloqueio da atividade simpática cardíaca (Mason, 1993). A Lidocaína e a Mixiletina bloqueiam os canais de Na^+ , interferindo na condução sinusal e suprimindo arritmias ventriculares e taquiarritmia por infarto agudo do miocárdio (Mason, 1993). O Propranolol e seus derivados (Atenolol, Acebutolol e o Sotalol) controlam a taxa ventricular nas taquiarritmias supraventriculares devido ao bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos (Mason, 1993). A Amiodarona previne a fibrilação atrial por bloquear os canais de K^+ e os receptores α e β -adrenérgicos cardíacos (Mason, 1993). O Verapamil e Diltiazem previnem as taquicardias supraventriculares causadas por reentrada nodal devido ao bloqueio dos VDCC tipo L (Mason, 1993).

Embora os fármacos mencionados sejam eficazes no tratamento medicamentoso dos vários tipos de arritmias cardíacas, estes possuem vários efeitos colaterais ou tóxicos indesejáveis, como efeito inotrópico negativo cardíaco e o efeito pró-arrítmico (Mason, 1993). Inúmeros fármacos vêm sendo estudados em modelos experimentais de arritmias cardíacas na tentativa de

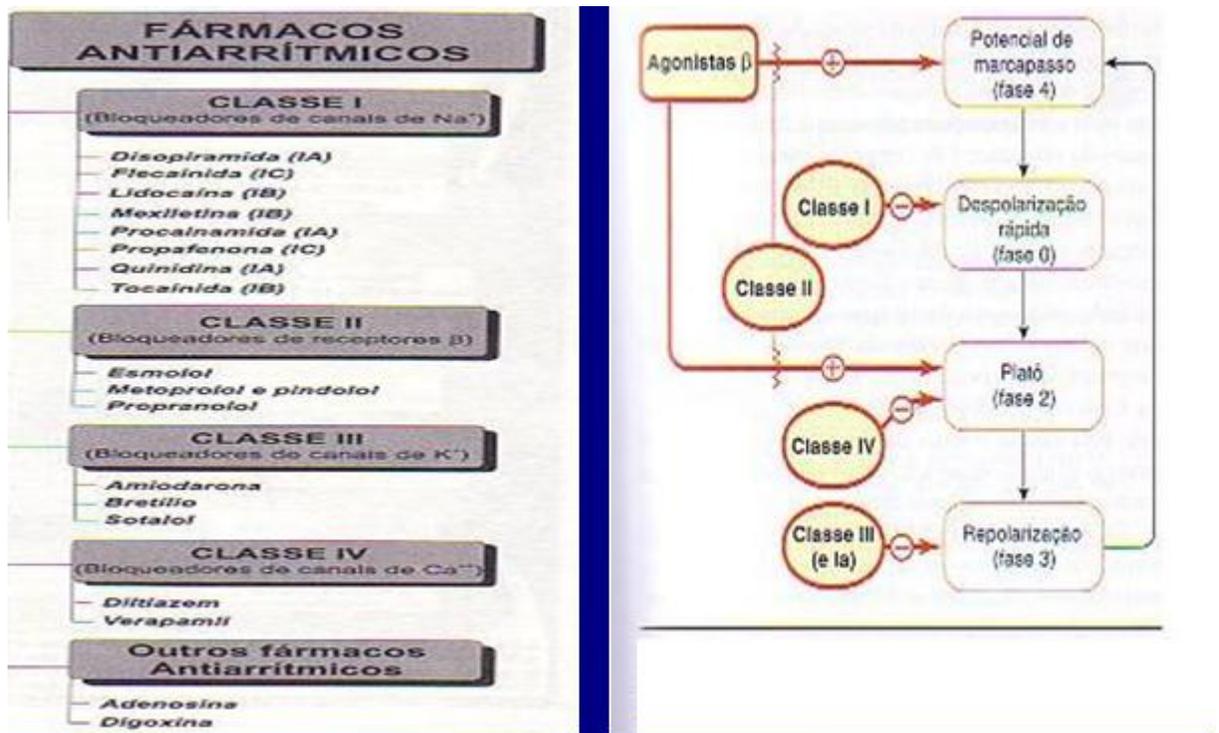


Fig. 7: Efeito dos agentes antiarrítmicos sobre as diferentes fases do potencial de ação cardíaco. (Goodman e Gilman, 2007).

descobrir novas estratégias farmacológicas de tratamento das arritmias cardíacas pelo emprego de fármacos dotados de maior eficácia e seletividade de ação anti-arrítmica e ainda menor toxicidade. Um exemplo disso é a introdução da adenosina na terapêutica anti-arrítmica.

A adenosina é um derivado das purinas capaz de restaurar de forma rápida o ritmo cardíaco em pacientes acometidos de taquiarritmias supraventriculares (Morady, 1999). Alguns estudos mostraram que os efeitos anti-arrítmicos da adenosina são mediados pela ativação de P₁-purinoceptores (receptores de adenosina), em especial do subtipo A₁, existentes nas células atriais e dos nodos sinoatrial e atrioventricular (Morady, 1999). Estes receptores estão acoplados à proteína G e sua ativação estimula as correntes de K⁺ sensível à acetilcolina (K_{ACH}) e inibe as correntes de Ca²⁺ mediadas pelos VDCC tipo L, resultando no encurtamento do potencial de ação nestas células (Morady, 1999).

Recentemente alguns estudos propuseram que os fragmentos derivados da heparina, como a enoxaparina, poderiam ser úteis no tratamento da fibrilação atrial devido a sua ação antitrombótica (Kim e cols, 2003). Todavia, esses estudos não descartaram a possibilidade de que os fragmentos de heparina poderiam interferir nos mecanismos envolvidos na gênese da fibrilação atrial (Kim e cols, 2003). Na mesma época, estudos realizados em cultura de miócitos vasculares de rato por Shinjo et al. (2002) propuseram que os fragmentos derivados da heparina eram capazes de reduzir a resposta contrátil destas células mediante a diminuição da [Ca²⁺]_i. O estudo propunha pela primeira vez que este efeito seria resultante da ativação do TNC pelos derivados da heparina e conseqüente aceleração da extrusão do Ca²⁺ dos miócitos vasculares (Shinjo et al. (2002).

Como mencionado anteriormente, a atividade do NCX é fundamental para a regulação da função cardíaca. Assim, o bloqueio da fibrilação atrial em pacientes tratados com derivados de heparina relatado por Kim e cols. (2003) provavelmente seria decorrente do aumento da extrusão de Ca²⁺ dos cardiomiócitos mediado pela ativação do NCX pelos derivados de heparina (Shinjo e cols., 2002). Esta hipótese vem sendo por pesquisadores ligados ao Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT) da UMC (Prof. Dr. Carlos Marcelo G. Godoy), Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da UMC (Prof. Dr. Ivarne Luiz S. Tersariol) e Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) (Prof. Dr. Afonso Caricati Neto).

Em 2006, como fruto dessa colaboração multidisciplinar e multi-institucional, foi publicado pela primeira vez, os resultados indicando que os fragmentos de heparina são capazes de bloquear as arritmias cardíacas (Dissertação de Mestrado apresentada á UMC por Juliana Duarte em 2006). Neste estudo experimental, foi mostrado que concentrações micromolares dos fragmentos derivados da heparina, como a Enoxaparina, são capazes de bloquear as arritmias induzidas por estimulação elétrica transmural (EET) em átrio direito isolado de rato. Embora os mecanismos moleculares e celulares não fossem totalmente conhecidos, este estudo seminal sugeria fortemente que os derivados de heparina eram dotados de atividade antiarrítmica. Á seguir, abordaremos as ações cardiovasculares dos derivados de heparina.

1.3. OS DERIVADOS DA HEPARINA E SUAS AÇÕES CARDIOVASCULARES

Do ponto de vista químico, a heparina é um polissacarídeo sulfatado com peso molecular de 3.000 a 30.000 daltons, dotada de ação anticoagulante por ativação da antitrombina III (Goddman & Gilman, 2007). Sua atividade por ser aumentada em até 1.000 vezes no sentido de inibir os fatores da coagulação IIa e Xa. A ligação da heparina à antitrombina III depende da presença de uma única seqüência de pentassacarídeo contida em cerca de um terço da molécula de heparina. Qualquer molécula de heparina que contenha o pentassacarídeo pode inibir a ação sobre Xa, simplesmente pela ativação as antitrombina III (Goddman & Gilman, 2007, p.1321-1328). Para inativar a trombina IIa, a heparina tem que se ligar a antitrombina III e ao fator IIa, simultaneamente, formando um complexo ternário, que só ocorre com cadeias mais longas com pelo menos 18 sacarídeos (Goddman & Gilman, 2007, p.1321-1328). Pela inativação da trombina, a heparina não somente previne a formação de fibrina, mas também inibe a ativação de plaquetas trombina-induzida e dos fatores V e VIII.

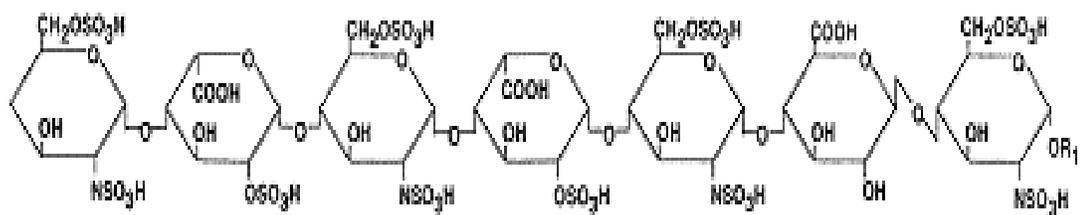
Dentre as varias propriedades biológicas da heparina destaca-se sua capacidade de ligar-se à proteína de superfície carregada positivamente (Goddman & Gilman, 2007, p.1321-1328). Além disso, a heparina pode ligar-se à proteína plasmática, proteínas liberadas de plaquetas e células endoteliais, resultando em resposta anticoagulante variável (Young e cols., 1994; Nader e Dietrich, 1989; Maciel, 2002).

A despolimerização química e enzimática da heparina gera fragmentos de heparina de baixo peso molecular, os quais são formando fragmentos de cerca de um terço do tamanho da heparina (Dietrich, 1989). O peso molecular destes fragmentos varia de 4.500 - 5.000 dáltons (Dietrich, 1989). As diferenças na atividade biológica da heparina não fragmentada e dos fragmentos de baixo peso molecular podem ser explicadas pela baixa capacidade de ligação destas às proteínas plasmáticas, o que torna a relação dose-efeito destes fragmentos mais precisa e sua meia vida plasmática mais longa (Dietrich, 1989). Estas propriedades produzem um efeito anticoagulante mais eficaz, seguro e com o mínimo de efeito colateral.

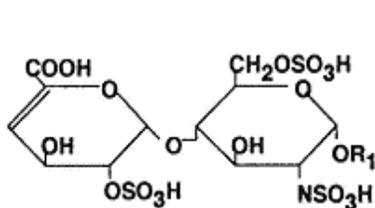
Os fragmentos de baixo peso molecular derivados da heparina são representados pela enoxaparina (4,5 kDa), Fraxiparina (5,5 kDa) e o dissacarídeo trissulfatado da molécula de heparina (DT) (Dietrich, 1989). Os outros compostos derivados da heparina são a Nadroparina (5 kDa) e a Ardeparina (7 kDa). A figura 7 mostra a estrutura química da heparina e de alguns derivados da heparina.

A heparina é capaz de formar complexos com diversos compostos químicos, dentre eles: íons inorgânicos (Ca^{2+} , Na^+ , etc), alquilaminas e alcalóides (Cloroeto de Cetilpiridina), corantes (Azul de Toluidina), aminas orgânicas (adrenalina, histamina, serotonina) proteínas básicas (globinas, protamina), proteínas plasmáticas (fibrinogênio, beta lipoproteína) e agentes farmacológicos (cloroquinas, estreptomicina, neomicina) (Dietrich, 1989).

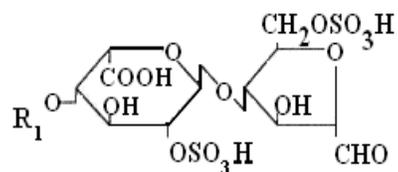
A heparina também pode alterar a atividade de numerosas enzimas orgânicas como o DNA polimerase, pepsinogênio, beta amilase, fosfatase ácida, miosina ATPase, renina, RNA polimerase e outras (Dietrich, 1989). Além disso, a heparina é capaz de modificar as ações de vários hormônios (ACTH, paratormônio, tiroxina, e outras) e a atividade das células de defesa imunológica (linfócito, macrófago e outras) (Dietrich, 1989). A heparina também inibe a reação de sensibilidade (broncoespasmo, reação antídoto-anticorpo), a divisão celular (mitose), além de interferir em vários outros processos biológicos (Young e cols., 1992). Todavia, a heparina é mais conhecida farmacologicamente por suas ações anticoagulante, antitrombótica e anti-hemostática (Dietrich, 1989).



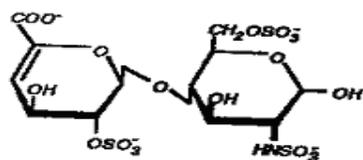
HEPARINA



ENOXAPARINA



FRAXIPARINA



**DISSACARÍDEO TRISSULFATO
DERIVADO DA HEPARINA (DT)**

Figura 8: Estrutura Química da molécula de Heparina e de alguns fragmentos derivados da heparina (Modificado de Dietrich e cols., 1999)

Os efeitos hemodinâmicos da heparina resultam, em parte, de sua ação sobre as células endoteliais e musculares lisas dos vasos sanguíneos (Dietrich, 1989). Sua ação vascular produz aumento do fluxo sanguíneo devido à redução da resistência vascular mediada pela vasodilatação (Shinjo et al., 2002). Este efeito parece ser resultante principalmente da redução da $[Ca^{2+}]_i$ nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos (Shinjo et al., 2002). Os mecanismos pelos quais a heparina e seus derivados reduzem a $[Ca^{2+}]_i$ ainda não permanece sob investigação.

Estudos clínicos realizados Kim e cols. (2003) sugerem que pacientes com disfunções cardíacas tratados com derivados de heparina apresentam baixa incidência de fibrilação atrial. O estudo sugere que os efeitos anti-arrítmicos dos derivados de heparina poderiam ser resultantes de sua ação anti-trombótica. Todavia, os estudos realizados em células musculares lisas por Shinjo e cols (2002) apontam para a possibilidade de que os derivados da heparina reduzem a $[Ca^{2+}]_i$ por meio do aumento da extrusão de Ca^{2+} mediado pela ativação do NCX. Este achado de Shinjo e cols (2002) leva a suposição de que a redução da $[Ca^{2+}]_i$ produzida pelos fragmentos derivados da heparina em cardiomiócitos poderia reduzir a predisposição do tecido cardíaco ao desenvolvimento de arritmias cardíacas.

A hipótese acima parece fundamentar os resultados publicados por Duarte em 2006 (Dissertação de Mestrado apresentada à UMC). Neste estudo, concentrações micromolares dos fragmentos de baixo peso molecular derivados da heparina, como a enoxaparina, foram capazes de bloquear as arritmias induzidas por estimulação elétrica transmural (EET) em átrio direito isolado de rato. Embora os mecanismos moleculares e celulares envolvidos neste efeito não fossem totalmente conhecidos, este estudo seminal sugere fortemente que os derivados de heparina são dotados de atividade antiarrítmica. O conhecimento dos mecanismos envolvidos nas ações anti-arrítmicas dos derivados de heparina poderia abrir caminho para o uso clínico desses fármacos no tratamento das DCV, incluindo as arritmias cardíacas, isquemia do miocárdio, angina pectoris, hipertensão arterial, intoxicação digitálica e outras (Antman e cols, 2002; Hodl e cols, 2002).

A atividade do NCX é regulada por meio de dois mecanismos principais, denominados de I_1 e I_2 (Hilgeman, 1990). Na regulação I_1 , a atividade da troca decai para um estado de equilíbrio estático após o aumento da concentração intracelular de Na^+ (Hilgeman, 1990). Esta regulação é mediada por uma porção específica da molécula do NCX denominada de “exchange inhibitor peptide” (XIP) (Hilgeman, 1990). O estado de inativação I_2 ocorre quando a $[Ca^{2+}]_i$ é reduzida

para valores abaixo de 200nM (Hilgeman, 1990). Quando a $[Ca^{2+}]_i$ se eleva para valores acima de 300nM, a ligação do Ca^{2+} ao NCX inibe o processo de inativação dependente do XIP, ativando a troca Na^+/Ca^{2+} (Matsuoka e cols, 1997).

Os estudos de Shinjo e cols (2002) também mostraram que somente os dissacarídeos insaturados derivados de heparina e o heparam sulfato, os quais possuem ligação glicosídica 1-4, tais como a Enoxaparina e o DT, promovem redução da $[Ca^{2+}]_i$ em células musculares lisas por meio de sua ação direta sobre o XIP. A análise do efeito da Enoxaparina feita por Shinjo e cols. (2002) sugere que sua porção insaturada relaciona-se à maior afinidade ao XIP, do que o DT. Portanto, no que se refere a possível ação dos fragmentos de heparina sobre arritmias cardíacas, é provável que a Enoxaparina e outros fragmentos de baixo peso molecular derivados da heparina com a mesma insaturação e ligação glicosídica, possuam efeitos cardíacos similares. Por outro lado, é provável que, além desta insaturação e ligação glicosídica, o tamanho da molécula possa também influenciar a atividade anti-arrítmica dos fragmentos de baixo peso molecular derivados da heparina.

Tendo em vista a relevância clínica dos fragmentos derivados da heparina, notadamente em relação o seu efeito antiarrítmico, estes poderiam reduzir os altos índices de hospitalização devido às arritmias cardíacas (Martinez e cols., 2002). Neste sentido, a caracterização *in vitro* da atividade antiarrítmica do anti-arrítmica dos fragmentos derivados da heparina constitui um subsídio experimental importante para a avaliação da eficácia terapêutica destes fármacos no tratamento de arritmias cardíacas em humanos.

2 OBJETIVOS

Visando aprofundar o conhecimento sobre a atividade antiarrítmica dos fragmentos derivados da heparina, no presente estudo decidimos investigar:

- (1) o efeito de derivados da heparina com peso molecular maior do que 4,5 kDa, como a Nadroparina (5 kDa) e a Ardeparina (7 kDa), no modelo de arritmia induzida pela estimulação elétrica transmural (EET) em átrio direito isolado de rato,
- (2) a relação entre o peso molecular desses fármacos e suas ações antiarrítmicas,
- (3) o efeito da Enoxaparina sobre as arritmias atriais induzidas pela EET, na vigência do bloqueio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) produzido pelo KB-R 7943,
- (4) o efeito dos derivados de heparina (Enoxaparina) sobre a força de contração e o relaxamento do átrio esquerdo de rato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, com idade de 4-6 meses, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). Os animais foram transferidos do CEDEME-UNIFESP para o biotério da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Neste biotério, os animais foram mantidos até o momento da experimentação em ambiente com condições padronizadas de alimentação, hidratação, temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidade e luminosidade. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno medindo 50 cm x 40 cm (4 a 5 animais por gaiola), forrada com maravalha esterilizada. Os animais receberam *ad libitum* ração comercial peletizada e água acidificada (HCl 1N, pH = 3).

3.2. Solução Fisiológica

Durante os experimentos, os átrios foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit (KH) com a seguinte composição (mM): NaCl 126,4; KCl 4,6; KH_2PO_4 1,2; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 13,6; CaCl_2 1,5; glicose 11,11. Esta solução foi saturada com carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2), sendo o pH da solução ajustado para 7,4 e a temperatura mantida constante a $36,5^{\circ}\text{C}$. O pH da solução foi medido por meio de pHmeter Q.400A (Quimis, São Paulo, SP-Brasil).

3.3. Preparação do Átrio para os Experimentos de Indução de Arritmia

Os procedimentos experimentais para o estudo dos derivados de heparina sobre as arritmias cardíacas foram realizados de acordo com as normas internacionais para experimentação animal preconizadas pelo “Canadian Council on Animal Care” (1993).

Inicialmente os animais foram submetidos a eutanásia por concussão cerebral. Os animais foram degolados para a realização dos processos cirúrgicos visando a remoção do coração. Para

tanto, a caixa torácica foi seccionada, os pulmões foram deslocados de sua posição original para permitir o acesso ao coração. Em seguida o coração foi exposto, isolado dos tecidos adjacentes e os vasos seccionados para liberação do coração.

Após a remoção, o coração foi imediatamente colocado em um becker contendo solução de KH. Nesta condição, procedeu-se a lavagem das câmaras internas do coração para retirada do sangue do interior das mesmas. Após a lavagem, o coração foi colocado sobre uma placa de Petri contendo solução de KH visando o isolamento dos átrios direito e esquerdo.

Por apresentar atividade contrátil espontânea mantida pelo nódulo sinusal, o átrio direito foi usado nos experimentos para estudo do efeito dos derivados da heparina sobre o cronotropismo cardíaco. Por ser isento de atividade espontânea, o átrio esquerdo foi usado nos experimentos para estudo do efeito dos derivados da heparina sobre o inotropismo cardíaco.

Os átrios isolados foram montados em sistema de órgãos isolados contendo solução de KH saturada com carbogênio e mantida á temperatura constante de 36,5°C.

Após a montagem, os átrios foram mantidos por um período de estabilização de 40 minutos para estabilização da preparação e após este foram realizados os protocolos de indução de arritmias cardíacas na ausência e na presença do derivados de heparina.

3.4. Protocolo Experimental de Indução de Arritmias Cardíacas

O protocolo de indução de arritmias cardíacas por estimulação elétrica transmural (EET) foi baseado no protocolo proposto por Godoy et al. (1999) e Faria et al. (2009). A montagem experimental utilizada nos protocolos de indução de arritmias consistiu-se de uma câmara de perfusão cilíndrica onde o átrio foi perfundido continuamente com solução nutritiva de KH. O excedente de solução foi removido do sistema por meio de um sistema de aspiração a vácuo. A temperatura da preparação foi mantida a 36,5° C por meio de um sistema de circulação de água dotado de aquecimento controlável modelo TP-500 da Guaymar (Gaymar Industries, Inc, USA). Este sistema permitia a passagem de água destilada pela câmara e sua recirculação foi realizada por meio de uma bomba de circulação de água conectada a um sistema de tubos de silicone. Um termômetro digital Multi-System foi usado para a medição direta da temperatura da solução na câmara de perfusão a cada 30 minutos.

Para a captação da atividade elétrica do átrio direito foram utilizados três eletrodos de prata-prata cloretada, sendo um deles o de referência (localizado na borda da câmara) e para estimulação foram utilizados dois fios de platina (eletrodos) conectados a uma unidade de estimulação isolada modelo SIU5 da marca Grass (Grass Inst. Div, Astro-Med Inc., W. Warwick, RI, USA) ligada a um estimulador elétrico de tensão(3) (Grass S48 – Stimulador; Grass Inst. Div., Astro-Med Inc, W. Warwick, RI, USA). Estes eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial modelo Iso-DAM8 da WPI (World Precision Instruments Inc, USA), cuja saída foi acoplada ao osciloscópio digital modelo TDS 210 da Tektronix Tektronix, USA) para monitoração do sinal.

As informações foram processadas e armazenadas em um computador marca LG[®] equipado com um processador Intel Pentium Core Dual de 1.6 Ghz e sistema operacional Windows[®] XP. A aquisição dos dados foi realizada por meio do programa computacional AqDados[®] 7.02 e a análise dos dados e geração dos registros foram feitos por meio do programa AqDAnalysis[®] 7 (Lynx Tecn. Electr. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A figura 8 mostra uma foto do sistema usado para indução de arritmias e o registro das respostas atriais.

3.5. Parâmetros Avaliados

A frequência dos átrios direito isolados foi expressa por meio do número de batimentos por minuto (bpm) e calculado pela expressão: $FC_{(bpm)} = 1 / T_{(s)} \times 60$ (bpm). Para testar a inducibilidade às arritmias, os átrios isolados foram submetidos ao protocolo de Godoy et al., Faria et al., (2009). Este protocolo será descrito posteriormente.

A força de contração do átrio esquerdo isolado foi expressa por meio do pico da força, medido diretamente do registro armazenado pelo sistema de aquisição de dados. Para quantificar o relaxamento, foi ajustado o período de relaxamento por meio de uma exponencial de primeira ordem: $R = T_0 + A1 * EXP(-t / \tau_R)$.

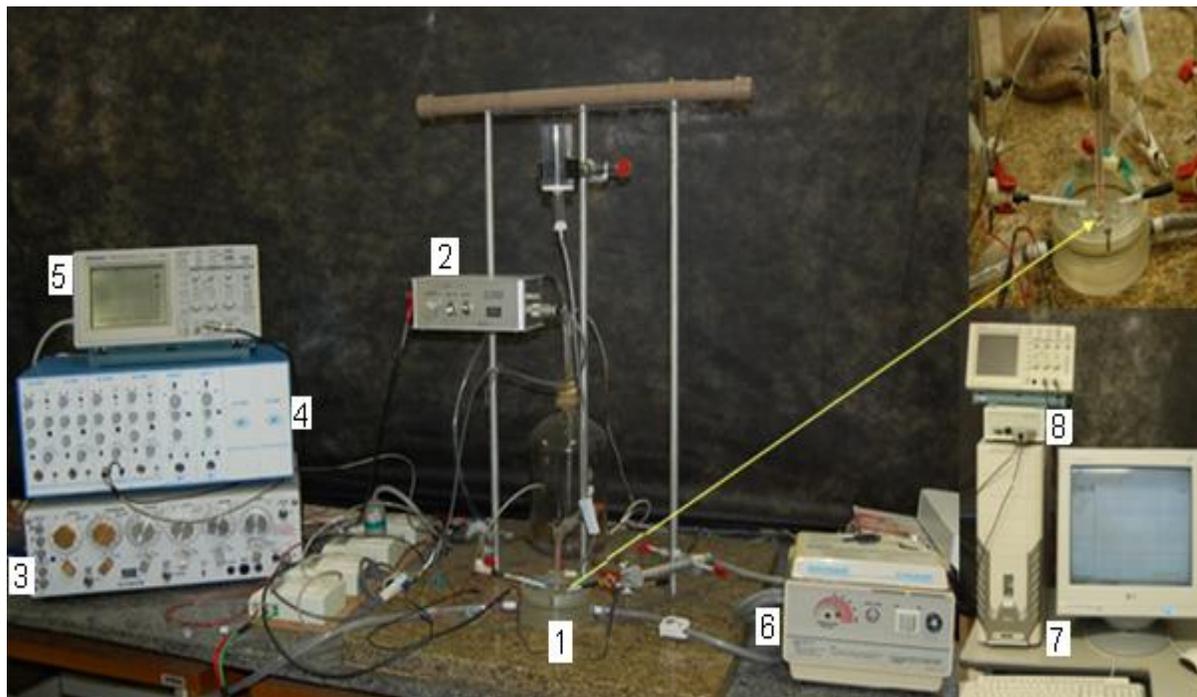


Figura 9. Foto ilustrando a montagem experimental utilizada para átrio isolado, contendo uma cuba cilíndrica de acrílico com base de vidro para perfusão (1), onde o átrio direito foi perfundido com solução de KH. A seta indica os eletrodos, sendo dois eletrodos de platina, utilizados para estimulação, foram posicionados diametralmente a cuba de perfusão, conectados a uma unidade de estimulação isolada(2) (Grass, SIU5 – Stimulus Isolation Unit; Grass Inst. Div., Astro-Med Inc., W. Warwick, RI, USA) ligada a um estimulador elétrico de tensão(3) (Grass S48 – Stimulador; Grass Inst. Div., Astro-Med Inc, W. Warwick, RI, USA). Também indicado pela seta, na cuba também havia três eletrodos de captação, de prata cloretada, sendo um de referência e dois de captação, conectado a um amplificador diferencial (4) (Word Precision Instruments, Inc; Isso-DAM8). O monitoramento do eletrograma atrial foi feito através de um osciloscópio digital (5) (Tektronix, TDS-210). A solução da cuba manteve-se aquecida por uma bomba de circulação e aquecimento de água controlável (6) (Gaymar Industries, Inc; TP-500), sistema formado por uma bomba circulatória contendo tubos e conexões que permitem a circulação de água destilada, aquecida pelo interior da cuba acrílica e seu retorno para bomba. As informações foram armazenadas em um microcomputador (7) (LG[®] processador Intel, Pentium Core Dual 1.6 Ghz e 100GB Ram com sistema operacional Windows[®] XP. O sinal captado foi acondicionado via programa de aquisição de sinal (8) (AqDados[®] 7.02), sendo os registros analisados no programa AqDAnalysis[®] 7 (Lynx Tecn. Electr. Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

3.6. Fármacos

Sobre as arritmias atriais induzidas eletricamente no átrio direito de rato, foram estudados os efeitos da Ardeparina (10 - 100 μ M), Nadroparina (10 - 100 μ M) e Enoxaparina (100 μ M). O peso molecular da Ardeparina corresponde a 7 kDa, o da Nadroparina corresponde a 5 kDa e o da Enoxaparina corresponde a 4,5 kDa. Também foi estudo o efeito destes derivados da heparina na presença do bloqueador seletivo do NCX KB-R 7943 (50 μ M). Os fármacos citados foram diluídos de soluções de KH. Estes fármacos foram cedidos pelo Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol (CIIB-UMC).

3.7. Protocolos Experimentais

Visando caracterizar os efeitos dos derivados da heparina sobre as arritmias induzidas eletricamente em átrio direito isolado de rato, foram realizados os seguintes protocolos experimentais:

Análise do efeito da Ardeparina e Nadroparina sobre os parâmetros eletrofisiológicos do átrio direito isolado de rato submetido ao protocolo de indução de arritmia por EET

Nestes ensaios, o átrio direito foi submetido ao protocolo de indução de arritmias, na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de Ardeparina (10, 30, 50 e 100 μ M) e de Nadroparina (10, 30, 50 e 100 μ M). O protocolo foi realizado da seguinte maneira: 1^a Tentativa na ausência de droga (controle); 2^a Tentativa na presença de droga (tratado) e 3^a Tentativa após a remoção da droga (lavado).

Análise da eficácia anti-arrítmica do fragmento de heparina em função do seu respectivo peso molecular

Para esta análise, o peso molecular dos derivados da heparina foi correlacionado com valor de eficácia destes em inibir as arritmias atriais eletricamente induzidas em átrio direito isolado de rato.

Análise do efeito da Enoxaparina sobre o átrio direito isolado de rato na vigência do bloqueio do TNC pelo KB-R 7943.

Para cada átrio, foi realizado o protocolo de indução de arritmia na ausência e na presença do bloqueador seletivo do NCX KB-R 7943 (50 μ M) e da Enoxaparina (100 μ M). Os fármacos citados foram testados nas seguintes condições: 1ª Tentativa na ausência de droga (controle); 2ª Tentativa na presença de droga (Enoxaparina) e 3ª Tentativa na presença de droga (KB-R7943). Também foram outros protocolos: 1ª Tentativa na ausência de droga (controle); 2ª Tentativa na presença de droga (KB-R7943) e 3ª Tentativa na presença de droga (Enoxaparina).

Análise do efeito dos derivados de heparina sobre a força de contração e o relaxamento da musculatura atrial

Neste ensaio realizado no átrio esquerdo de rato, foi determinado o valor máximo da força de contração atrial (pico de contração atrial) e o tempo de decaimento da força (relaxamento atrial), na ausência e na presença dos derivados da heparina (Enoxaparina 100 μ M). A adição deste fármaco foi feita 20 minutos após a estabilização do átrio.

3.8. Protocolo de Indução de Arritmias Atriais

O protocolo de indução de arritmia atriais por EET foi baseado em Godoy et al. (1999) e Faria et al. (2009). O protocolo consiste da aplicação de um conjunto de até 6 trens de pulsos com as seguintes características: 250 pulsos bipolares de tensão, 5 ms de duração, intervalo entre pulsos de 15 ms. A amplitude do pulso foi ajustada e expressa como múltiplos inteiros do limiar

atrial (LA). Na ausência de fármacos na solução de perfusão (Controle; N = 10), não foi possível induzir arritmia com trens de pulsos com amplitude igual a 1x LA, mesmo aplicando-se mais de 6 trens de pulsos. Aumentando-se sequencialmente a amplitude para 2x, 3x, 4x, 5x e 6x LA a cada conjunto de 6 trens, induziu-se arritmia, respectivamente com os seguintes números de trens: 3-4; 2-3; 1-2; 1 e 1 (vide figura 9). Este resultado foi reproduzível no mínimo três vezes para cada uma das amplitudes de estímulo testadas. Desta forma, a aplicação de trens de pulsos com amplitude igual 6x LA, implica em indução de arritmia com um único trem (inducibilidade máxima do protocolo de indução), enquanto que a aplicação de trens com amplitude igual a 1x LA implica em não indução (inducibilidade nula do protocolo de indução).

A partir da caracterização da inducibilidade do protocolo de indução de arritmia, utilizamos o mesmo em testes com fármacos. A seqüência de testes foi essencialmente a mesma do controle, ou seja, foram aplicados um conjunto de até 6 trens (amplitude inicial de 2x LA), após 40 minutos de estabilização do átrio na presença do fármaco. Para a indução da arritmia, a amplitude foi aumentada em 1 unidade (x LA), até atingir o valor máximo de 6x LA. Foi estabelecido que a ausência de arritmia, mesmos com trens de igual a 6x LA e na presença do fármaco, corresponde à eficácia máxima do fármaco.

Isto implica que o efeito do fármaco é antiarrítmico e sua eficácia é máxima. Foi estabelecido que a arritmia obtida em resposta aos trens com amplitude igual a 2x LA na vigência do fármaco corresponde a uma eficácia nula do fármaco. Vale ressaltar que 1x LA, corresponde amplitude máxima para a qual não há indução. Portanto, a amplitude máxima do trem de pulsos para a qual não ocorre arritmia (variando de 1 a 6) expressa a eficácia do fármaco em afetar a inducibilidade de arritmia do átrio. Portanto, considerou-se a amplitude de estímulo como sendo o efeito antiarrítmico.

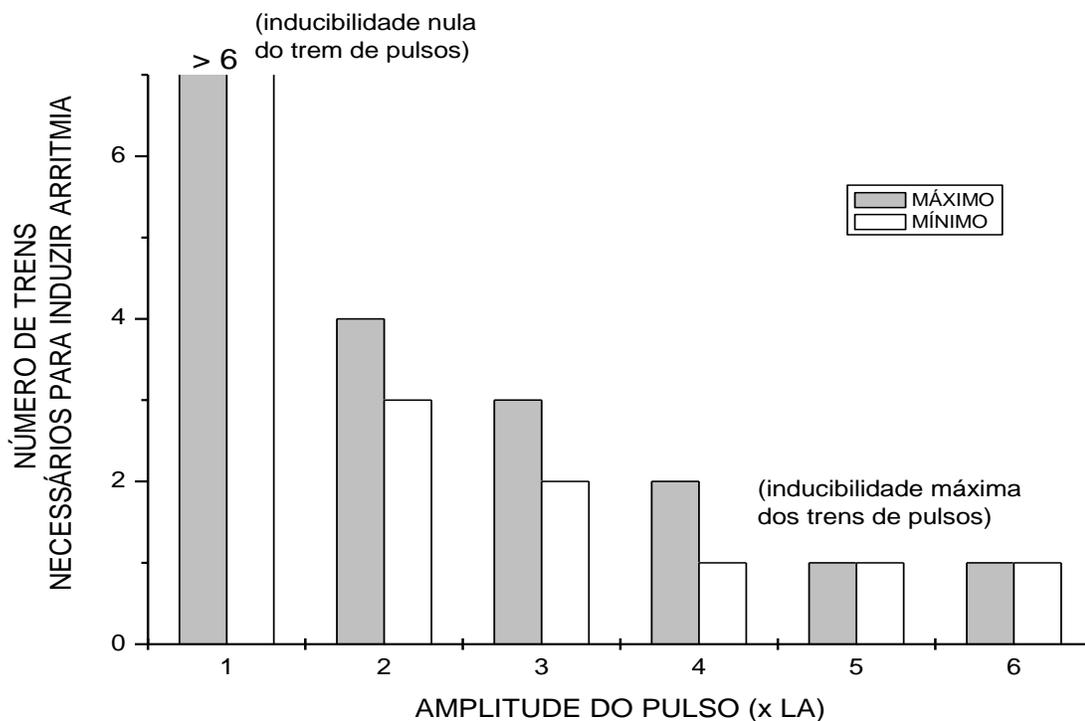


Figura 10: Gráfico ilustrando o número de trens (250 pulsos, duração de 5ms, intervalo entre pulsos de 15ms) mínimos e máximos necessários para indução de arritmia em função da amplitude de estímulo do trem (expresso com múltiplo do limiar atrial, LA). Para amplitude igual a 1x LA, não foi possível induzir arritmia (inducibilidade nula do trem de pulsos). Para amplitudes iguais a 5x ou 6x LA, arritmias foram induzidas logo no primeiro trem (inducibilidade máxima do trem de pulsos).

3.9. Registro da força de contração para o estudo dos efeitos dos derivados de heparina sobre o inotropismo atrial

O isolamento do átrio esquerdo de rato e sua montagem na cuba de perfusão foram os mesmos já descritos anteriormente para o átrio direito. Uma vez na cuba, o átrio esquerdo foi fixado em uma de suas extremidades por um dos eletrodos de estimulação de platina. A outra extremidade atrial foi fixada com um pequeno gancho ligado a um transdutor de força (Straing Gauge, modelo Fort 10 01A, World Precision Instruments) via fio de algodão. O transdutor está acoplado ao “charriot” de um microscópio, viabilizando o controle e medida do estiramento atrial. O átrio esquerdo foi estimulado a uma frequência de 2 Hz (pulso de 5ms de duração; amplitude 2x o limiar atrial).

O estiramento atrial foi ajustado para que o pico de força fosse 80% do máximo obtido. Após um período de estabilização de 40 minutos, adicionamos Enoxaparina ao banho de perfusão numa concentração de 100 μ M. A força foi registrada e armazenada (sistema de aquisição computadorizado já mencionado) durante todo o experimento. A partir destes registros, medimos os picos da força de contração e a cinética de relaxamento da força de contração nas condições de ausência ou presença da Enoxaparina.

O pico da força foi medido diretamente do registro da força armazenado pelo sistema de aquisição de dados. Para quantificar o relaxamento ajustamos o período de relaxamento (vide figura 8) à seguinte exponencial de primeira ordem: $R = T_0 + A1 * \text{EXP} (- t / \tau_R)$, onde R é o relaxamento atrial em função do tempo, T_0 é uma constante relacionada ao tônus muscular, A1 é uma constante relacionada à amplitude da força, t é a variável tempo (de relaxamento), τ_R é a constante de relaxamento. Desta forma, τ_R expressa a cinética de relaxamento da contração atrial, pois quanto menor for τ_R que ajusta a curva R de diminuição da força, mais rápido é o relaxamento. A figura 10 mostra os parâmetros calculados em relação a contração e o relaxamento do músculo atrial.

FORÇA ATRIAL (isométrica)

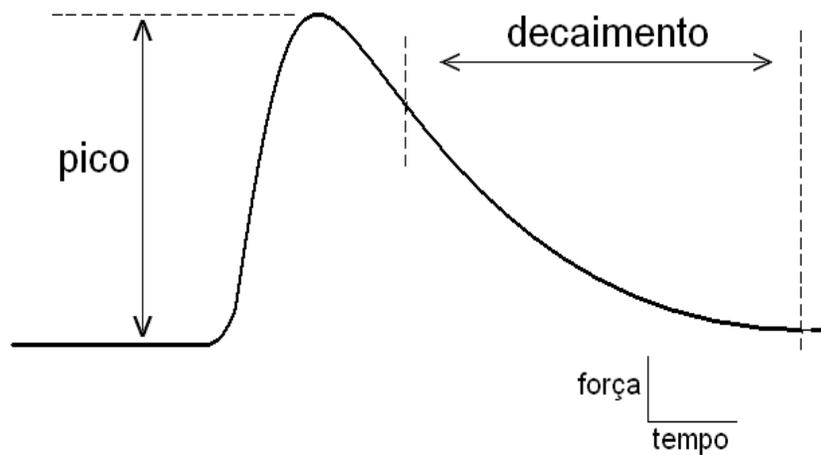


Figura 11: Ilustração mostrando o perfil da contração isométrica do átrio. A contração máxima do átrio foi calculada por meio da variação do tônus basal base e o pico da contração. O relaxamento do átrio foi calculado pelo decaimento da força de contração após o pico. A cinética de relaxamento foi calculada por meio do ajuste da curva exponencial (1ª ordem). A partir desta curva, foi determinada a constante de relaxamento (τ_R).

4 RESULTADOS

4.1. Caracterização do Modelo de Arritmias Atriais

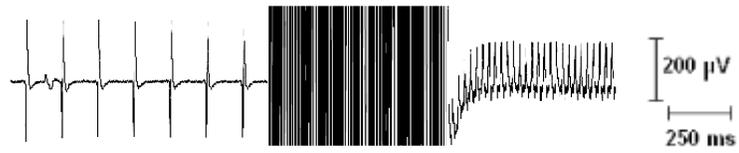
Antes da EET, a frequência detectada no átrio direito (AD) de rato variou de 140 a 180 bpm (vide figura 10 e tabela I). Estes valores não foram distintos dos valores obtidos anteriormente usando a mesma metodologia de estudo (Godoy et al., 1999; Faria et al., 2009). Após a EET, a frequência atrial aumentou em cerca de 10 vezes em relação a frequência antes da EET (vide figura 10 e tabela I). Estes valores foram similares aqueles obtidos em estudos prévios (Godoy et al., 1999; Faria et al., 2009) e caracterizam a ocorrência de taquiarritmias atriais. A amplitude da EET necessária para a indução das arritmias atriais (AENIA) foi de 2x LA, ou seja, similar àquela obtida em estudos prévios usando a mesma metodologia de indução de arritmia atrial (Godoy et al., 1999; Faria et al., 2009). Conforme demonstrado por Godoy et al. (1999) e Faria et al. (2009), estas taquiarritmias atriais induzidas por EET podem ser bloqueadas pelo antagonista de receptores muscarínicos Atropina, mesmo utilizando um valor de AENIA superior a 6x LA.

4.2. Efeito dos Derivados de Heparina nas Arritmias Atriais

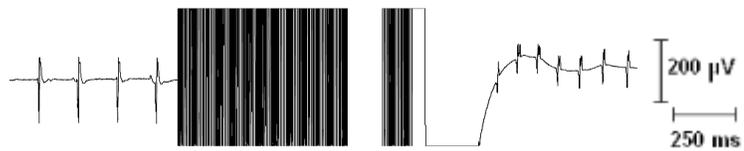
De forma similar ao efeito da Atropina, mencionado anteriormente, a incubação prévia do AD de rato com concentrações micromolares de Ardeparina (ARDE) ou Nadroparina (NADRO) foi capaz de bloquear as taquiarritmias atriais induzidas pela EET (vide figura 11). As tabelas I e II mostram os parâmetros eletrofisiológicos obtidos antes e após a EET em AD de rato, na ausência (controle) e na presença da ARDE ou NADRO 10, 30, 50 e 100 μM .

Nos AD tratados com ARDE (30, 50 e 100 μM), a frequência atrial variou de 143 a 154 bpm (tabela I). Estes valores foram similares aos obtidos antes da EET (vide tabela I). A AENIA nos AD tratados com ARD (30, 50 e 100 μM) foi superior a 6x LA (vide tabela 1). Na presença de ARDE, não foi possível induzir arritmia nos AD mesmo aplicando AENIA superiores a 6x LA (vide figura 11 e tabela I). Resultados similares foram obtidos pelo uso da NADRO (vide tabela I).

Controle



+ Ardeparina 30 μM



+ Nadroparina 50 μM

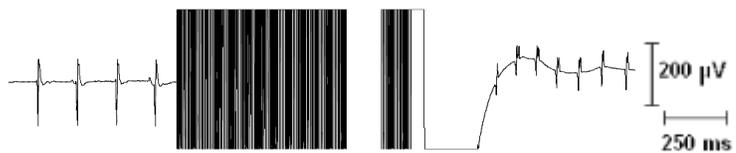


Figura 12. Eletrograma típico mostrando o efeito da Ardeparina 30 μM e Nadroparina 50 μM em átrio direito isolado de rato submetido á EET. Notar a freqüência atrial obtida antes e após a EET (linhas verticais no meio do registro).

Tabela 1. Parâmetros eletrofisiológicos do átrio direito isolado submetido ao protocolo de EET, na ausência (controle) e na presença de Ardeparina (10 – 100 μ M).

	Controle	ARDEPARINA			
		10 μ M	30 μ M	50 μ M	100 μ M
Frequência Natural (bpm)	144 \pm 8	150 \pm 5	142 \pm 5	154 \pm 8	143 \pm 6
Amplitude Para Indução de Arritmia (x limiar atrial)	2	3	>6	>6	>6
Frequência da Arritmia (bpm)	916 \pm 166	1000 \pm 80	Ausência Arritmia	Ausência Arritmia	Ausência Arritmia
Duração da Arritmia (s)	>60	50	--	--	--

Os valores correspondem a média \pm SEM de 4 ou 12 experimentos. No grupo controle foram realizados 12 experimentos e no grupo Ardeparina foram realizados 4 experimentos para cada concentração deste fármaco. A frequência natural foi registrada antes de cada arritmia. bpm = batimentos por minuto. O valor >6 indica que não foi possível induzir arritmia, mesmo aplicando mais de 6 trens de pulso.

Tabela 2. Parâmetros eletrofisiológicos do átrio direito isolado submetido ao protocolo de EET, na ausência (controle) e na presença de Nadroparina (10 – 100 μ M).

	Controle	NADROPARINA			
		10 μ M	30 μ M	50 μ M	100 μ M
Frequência Natural (bpm)	180 \pm 7	173 \pm 5	120 \pm 9	130 \pm 5	125 \pm 4
Amplitude Para Indução de Arritmia (x limiar atrial)	2	2	4	>6	>6
Frequência da Arritmia (bpm)	1102 \pm 9	960 \pm 8	600 \pm 7	Ausência Arritmia	Ausência Arritmia
Duração da Arritmia (s)	>60	>60	<60	--	--

Os valores correspondem a média \pm SEM de 4 ou 12 experimentos. No grupo controle foram realizados 12 experimentos e no grupo Nadroparina foram realizados 4 experimentos para cada concentração deste fármaco. A frequência natural foi registrada antes de cada arritmia. bpm = batimentos por minuto. O valor >6 indica que não foi possível induzir arritmia, mesmo aplicando mais de 6 trens de pulso.

4.3. Estudos Quantitativos do Efeito Inibitório dos Derivados da Heparina nas Arritmias Atriais

4.3.1. Relação entre o efeito antiarritmico e a concentração dos derivados de heparina

Os estudos preliminares dos efeitos da ARDE e NADRO sobre as taquiarritmias induzidas por EET em AD de rato, descritos no tópico anterior, mostraram de forma clara estas arritmias são bloqueadas pelos referidos derivados da heparina. Estes resultados sugerem que a ARDE e a NADRO são dotadas de atividade anti-arritmica. Desta forma, foi necessário estabelecer as relações quantitativas entre o efeito inibitório e a concentração molar desses fármacos. Estas permitem calcular a potência e a eficácia anti-arritmica da ARDE e NADRO.

O efeito inibitório da ARDE e NADR sobre as taquiarritmias atriais induzidas por EET foi dependente da concentração molar empregada. A figura 12 mostra a curva concentração-efeito (CCE) da ARDE e NODRA em comparação com outros fragmentos derivados da heparina. A análise das CCE permite avaliar a concentração molar do fármaco capaz de produzir 50% do efeito máximo. Este parâmetro definido como CE_{50} expressa a potência do fármaco para produzir um determinado efeito farmacológico. O CE_{50} também permite estimar a afinidade aparente do fármaco pelos seus sitios de ligação nas células (receptores). O CE_{50} da ARDE, NADRO, ENOX e DT foi de 20, 30, 60 e 300 μM , respectivamente. Portanto, a potencia anti-arritmica da ARDE foi 1,5 vezes maior em relação a NADRO, 2 x vezes maior em relação a ENOX e 15 vezes maior em relação ao DT (vide figura 12). Em concentrações de 10 – 1000 μM , o análogo do DT e a heparina foram incapazes de bloquear as arritmias induzidas por EET no AD de rato.

Amplitude de Estímulo Necessária
para indução de arritmia.

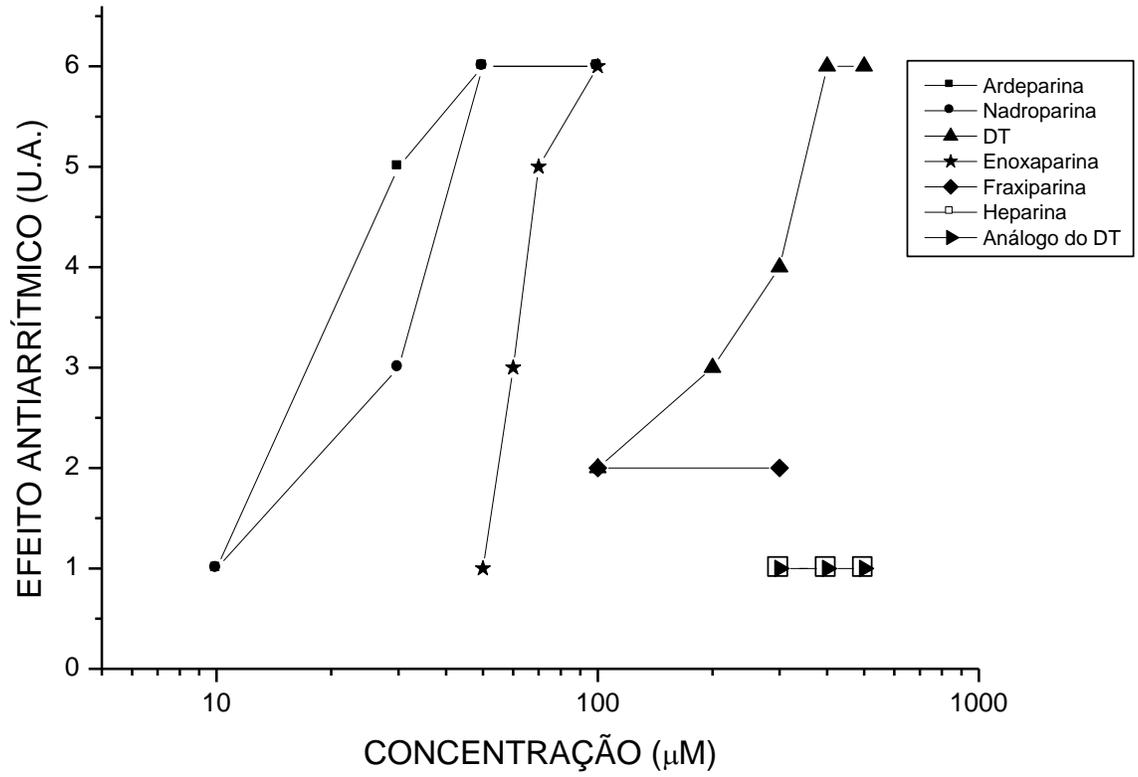


Figura 13. Curva concentração-efeito dos fragmentos derivados da heparina. (N= 4 - 6)

4.3.2. Relação entre o efeito antiarritmico e o peso molecular dos derivados de heparina

O peso molecular da ARDE (7 kDa) é maior do que o da NADRO (5 kDa) e o da ENOX (4,5 kDa). A potencia anti-arritmica da ARDE ($CE_{50} = 20 \mu\text{M}$) também é maior do que a da NADRO ($CE = 30\mu\text{M}$) e a da ENOX ($60\mu\text{M}$). A figura 12 mostra a relação entre a concentração mínima do derivado de heparina para produzir o efeito antiarrítmico máximo e seus respectivos pesos moleculares. Os resultados mostraram que o efeito antiarrítmico da ARDE foi maior comparados aos demais derivados da heparina, incluindo a NADRO, ENOX, DT e a heparina (figura 13). Por outro lado, o DT, com o menor peso molecular entre os fragmentos, foi o menos efetivo como antiarrítmico comparado aos demais derivados da heparina (figura 13). Portanto, quanto maior o peso molecular do derivado de heparina maior é sua potência anti-arritmica.

4.4. Efeito do Bloqueio do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sobre a Ação Anti-arritmica dos Derivados da Heparina

Os estudos realizados por Shinjo e cols. (2002) em cultura de células musculares lisas vasculares sugerem que os derivados da heparina podem reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por aumentar a extrusão do Ca^{2+} por meio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TNC). Este efeito poderia contribuir para o relaxamento da musculatura lisa vascular (Shinjo et al., 2002). No presente estudo, avaliamos a possibilidade do envolvimento do NCX no efeito anti-arritmico dos derivados da heparina. Para tanto, foi estudado o efeito do bloqueio do NCX pelo KB-R 7943 sobre a ação anti-arritmica da ENOX.

A figura 14 mostra os efeitos do bloqueador do NCX KB-R7943 $50 \mu\text{M}$ e da ENOX $100\mu\text{M}$ em AD de rato submetido á EET. A EET produziu taquiarritmia atrial no AD controle, mas o tratamento do AD com ENOX $100\mu\text{M}$ bloqueou a indução das taquiarritmias atriais (figura 14). O tratamento do AD com KB-R7943 $50\mu\text{M}$, não bloqueou as taquiarritmias atriais (figura 14). As taquiarritmias ocorridas na presença do KB-R7943 foram diferentes daquelas obtidas no controle, pois houve uma irregularidade no ritmo atrial em relação àquela obtida no AD tratado

com KB-R7943. O tratamento do AD com o KB-R7943 + ENOX também não bloqueou a indução

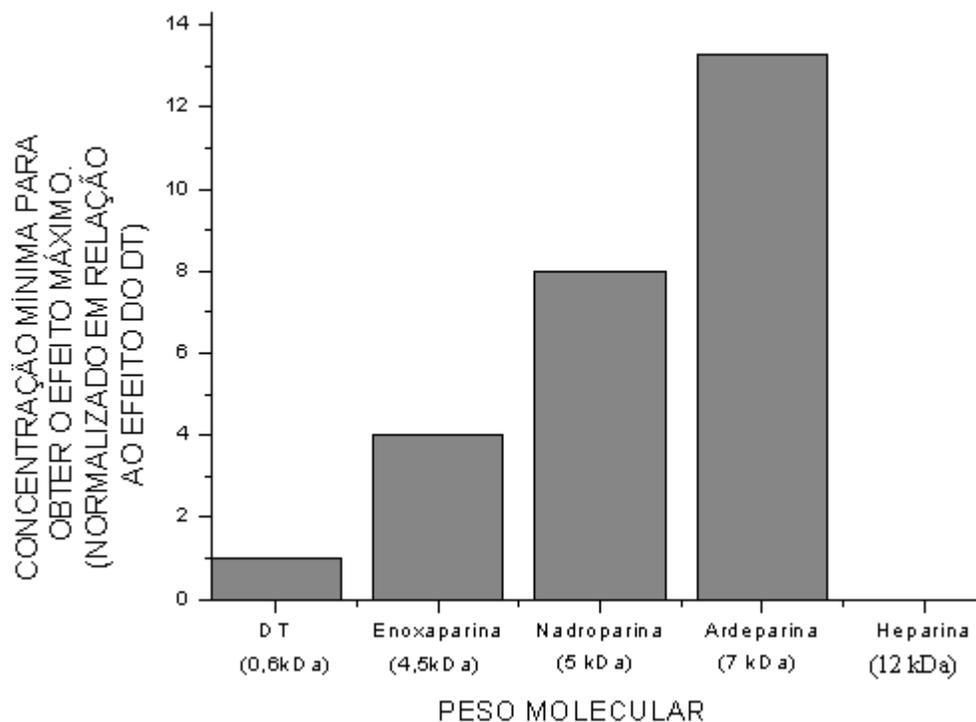


Figura 14. Histograma mostrando a relação entre a concentração mínima para indução do efeito antiarrítmico máximo e o peso molecular dos derivados de heparina. (N=4 - 6)

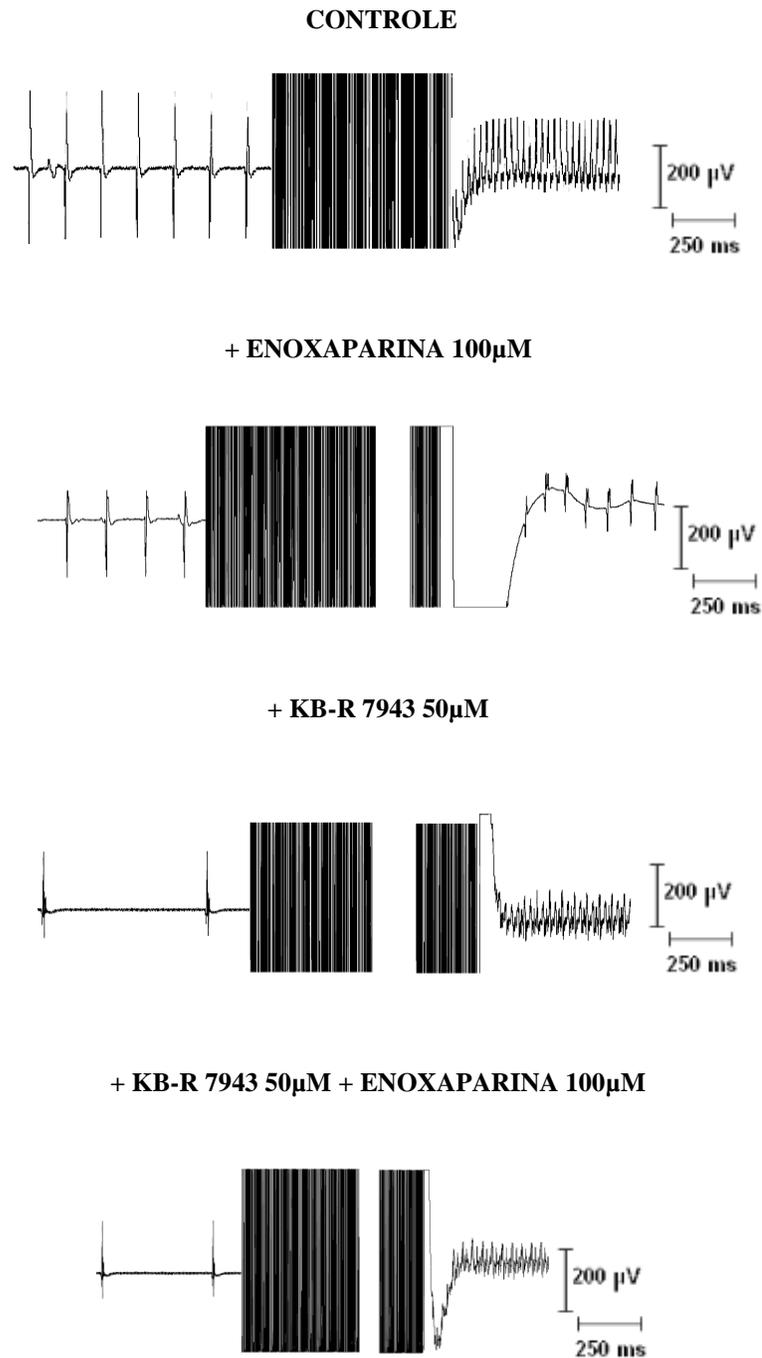


Figura 15: Eletrograma típico obtido em átrio direito isolado de rato submetido á EET, na ausência (controle) e na presença de Enoxaparina ou KB-R7943 ou de Enoxaparina + KB-R7943. Notar que foi possível induzir taquiarritmia atrial em todos os átrios, exceto aqueles tratados somente com Enoxaparina. A incubação do KB-R7943 tornou o átrio susceptível á arritmia induzida por ETT.

das taquiarritmias atriais. A inversão da ordem de incubação dos fármacos testados não alterou os resultados relatados anteriormente.

4.4.1. Efeito do Bloqueio do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sobre a amplitude de estímulo necessário para indução de arritmias atriais

A figura 15 mostra a amplitude de estímulo necessário para indução de arritmia atriais (AENIA) no AD de rato controles ou tratados com KB-R 7943 50 μM ou KB-R 7943 50 μM + ENOX 100 μM . No AD controle (ausência de fármacos), a EET induziu taquiarrimias com AENIA de 2x LA. No AD tratado com KB-R 7943 50 μM (incubado 5 minutos antes da EET), o AENIA foi similar ao controle (2x LA). No AD tratado com ENOX 100 μM (incubado 30 minutos antes da EET) + KB-R 7943 50 μM (incubados 5 minutos antes da EET), o AENIA foi de 2x LA.

4.4.2. Efeito do Bloqueio do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sobre o número de trens de pulsos necessários para indução de arritmia atriais

A figura 16 mostra o número de trens necessários para indução de arritmia no AD de rato controles ou tratados com KB-R 7943 50 μM ou KB-R 7943 50 μM + ENOX 100 μM . No AD controle (ausência de fármacos) foi necessário 5 trens de pulsos para induzir arritmia. No AD tratado com KB-R 7943, a indução de arritmia foi facilitada, sendo necessário apenas 1 trem de pulso para indução de arritmia. No AD tratado com KB-R 7943 + ENOX não houve diferença do número de trens de pulsos necessários para indução de arritmia em relação ao AD tratado somente com KB-R 7943.

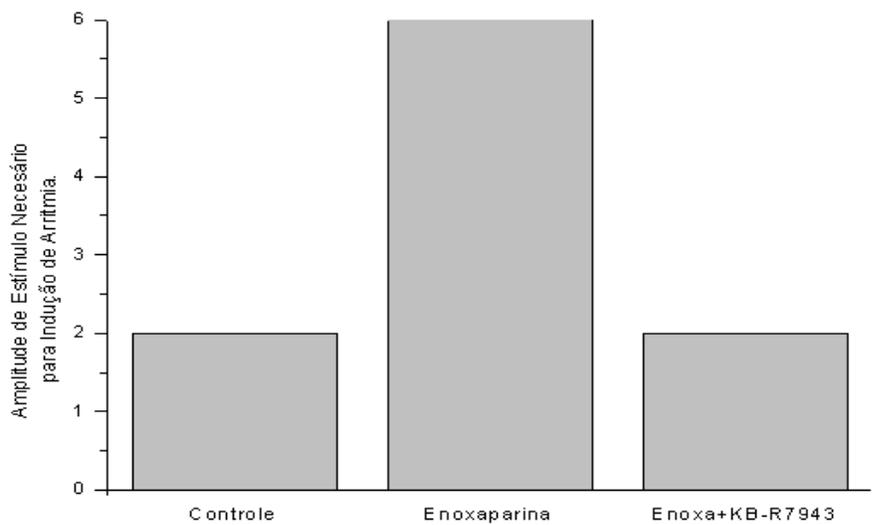
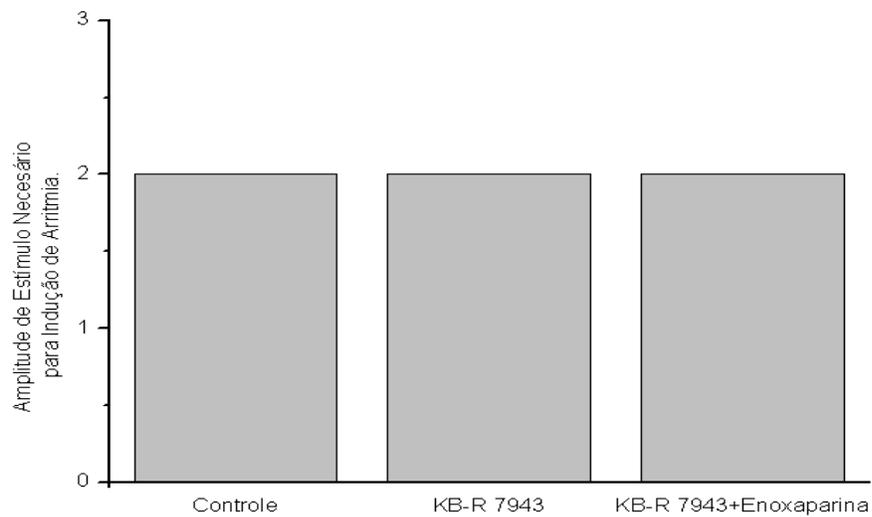


Figura 16: Histogramas mostrando a amplitude de estímulo necessária para a tentativa indução de arritmia em atrio direito de rato, na ausência (controle) e na presença de KB-R 7943 50 μ M, Enoxaparina 100 μ M ou KB-R 7943 50 μ M + Enoxaparina 100 μ M. Gráficos com resultados histocráticos.

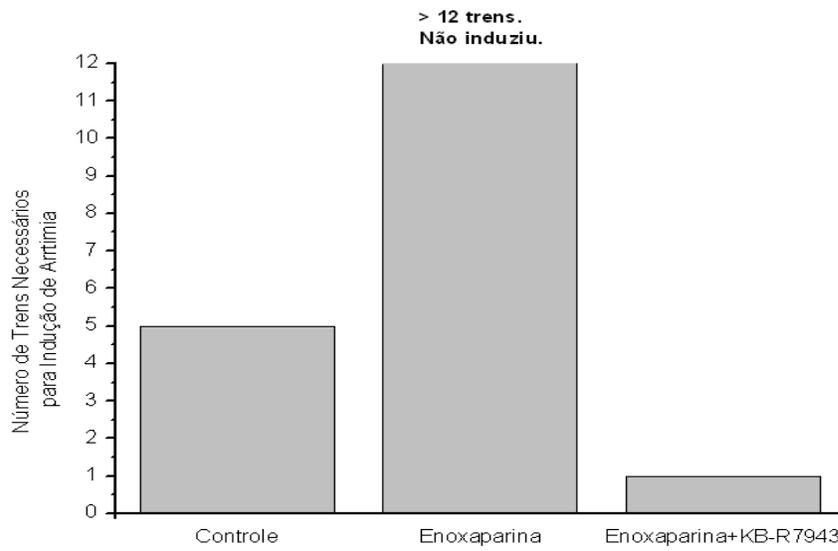
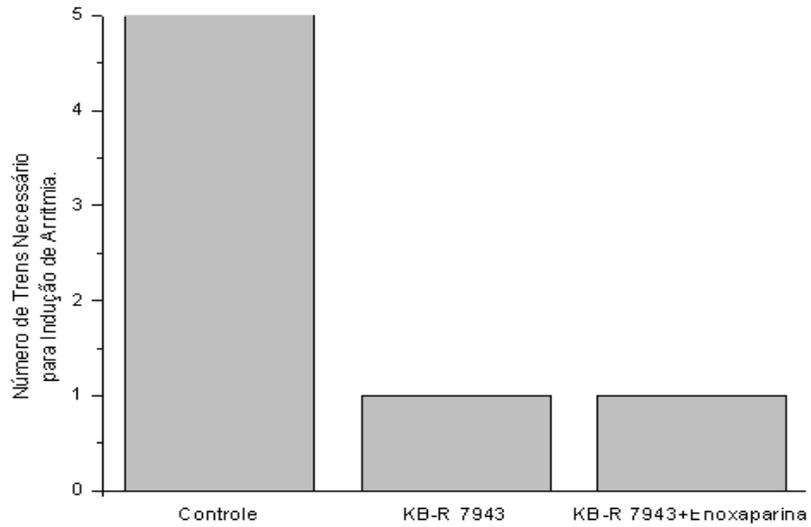


Figura 17: Histograma mostrando o número de trems de pulsos necessários para indução de arritmia em átrio direito de rato, na ausência (controle) e na presença de KB-R 7943 50 μ M, Enoxaparina 100 μ M ou KB-R 7943 50 μ M + Enoxaparina 100 μ M. Gráficos com resultados histocráticos.

4.5. Efeito dos Derivados de Heparina sobre a força de contração e o relaxamento atrial

A figura 17 mostra o efeito da ENOX 100 μM sobre a força de contração do átrio esquerdo (AE) de rato. A força foi normalizada em relação ao tempo de 10 minutos de experimento. No AE controle (ausência de ENOX) observa-se um aumento do pico da força até o final do experimento em cerca de 10% em relação ao valor inicial. No AE tratado com ENOX 100 μM por 30 minutos, observa-se uma queda no pico da força atrial em cerca de 50% em relação ao valor inicial.

A figura 18 mostra o efeito da ENOX 100 μM sobre o decaimento (normalizado) da força durante o relaxamento do AE de rato. No AE tratado com ENOX, o decaimento da curva atingiu 80% do seu valor inicial em cerca de 40 ms antes do decaimento observado no AE controle (ausência de ENOX).

A figura 19 mostra o efeito da ENOX 100 μM sobre o valor de TAU obtido a partir da curva de decaimento durante o relaxamento atrial. No AE tratado com ENOX, os valores do TAU foram menores em relação aqueles obtidos nos AE controles (ausência de ENOX).

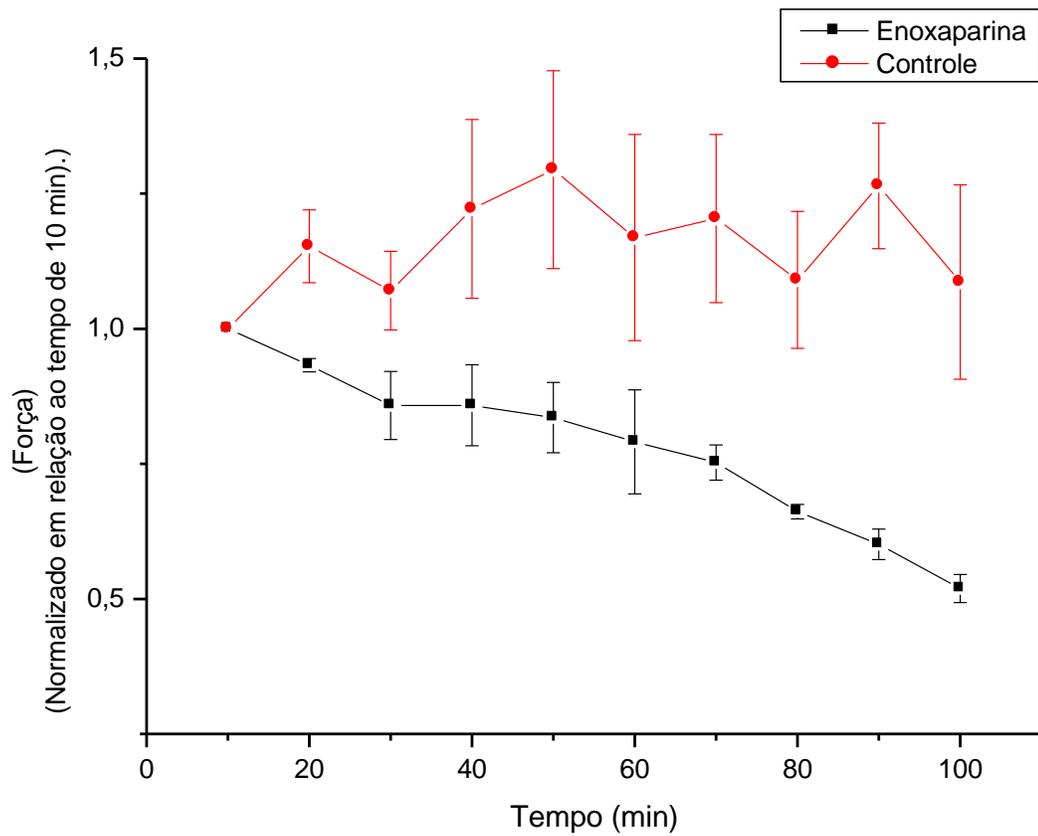


Figura 18: Gráfico mostrando o efeito da Enoxaparina 100µM sobre a força de contração do átrio esquerdo de rato. Notar que a Enoxaparina reduziu a força de contração atrial. (N=4)

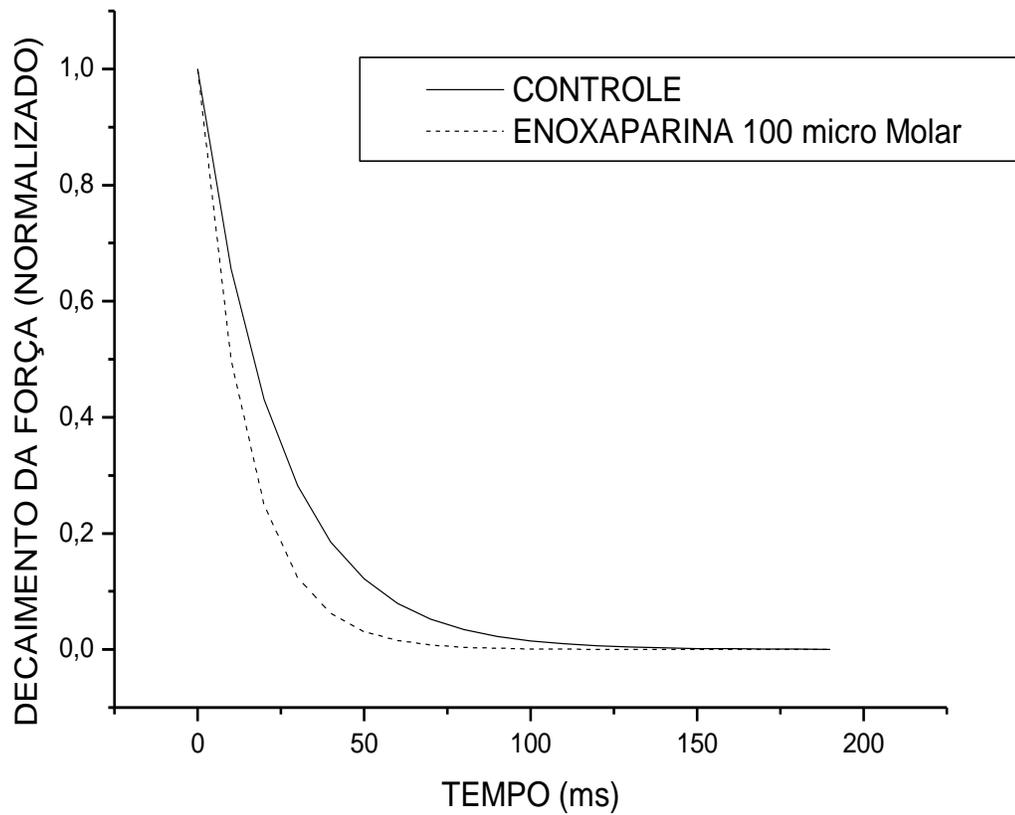


Figura 19: Gráfico mostrando o efeito da Enoxaparina 100 μ M sobre o decaimento da força de contração do átrio esquerdo de rato. Notar que a Enoxaparina acelerou o decaimento da força de contração atrial (N=4). Equação determinante das resultantes da TAU, $R = T_0 + A1 * EXP (- t / \tau_R)$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos de 3 moléculas derivadas da heparina, a Ardeparina (ARDE), a Nadroparina (NADRO) e a Enoxaparina (ENOX), sobre as arritmias induzidas pela EET em átrio direito isolado de rato. Adicionalmente, este estudo investigou o efeito dos derivados da heparina sobre a força de contração e o relaxamento da musculatura atrial de rato.

O estudo quantitativo do efeito antiarrítmico dos derivados da heparina (ARDE, NADRO e ENOX) mostrou uma relação entre a potencia antiarrítmica e o peso molecular desses derivados. Tendo em vista, aprofundar o entendimento da ação da ENOX sobre o NCX, nosso estudo também comparou a alteração da força de contração e o relaxamento da musculatura atril, por meio de uma análise do pico e da cinética de decaimento da força na presença da Enoxaparina.

A quantificação do efeito antiarrítmico foi baseada em trabalho de Godoy e cols (1999), o qual também já foi base para outros trabalhos. Por exemplo, Zafalon (2001), estudou a influência de agentes farmacológicos (ex: carbacol, AMPcíclico e verapamil) sobre a indução de arritmias atriais. Contudo, diferente de nossa abordagem atual, aquele estudo baseado no fenômeno do tipo “tudo ou nada” (induz ou não induz) incidente numa seqüência de tentativas de indução. Em nosso estudo utilizamos a amplitude de estímulo como indicador de inducibilidade de arritmias atriais. Em estudo similar, Kirchhof e cols (2003) mostraram o efeito antiarrítmico da amiodarona sobre a fibrilação ventricular. Este estudo mostrou uma associação direta entre a amplitude dos trens de pulsos com a inducibilidade de arritmias.

Empregando a mesma metodologia, Duarte et al (2005), verificou que outros fármacos (ex: atropina e fragmentos de heparina) são capazes de bloquear as arritmias atriais. Faria e cols, (2008), utilizou o mesmo protocolo deste trabalho para desenvolver uma metodologia específica e reprodutível para induções de arritmias em átrio direito isolado de ratos de diferentes idades e também utilizou a metodologia desenvolvida para verificar o efeito arritmogênico da estimulação colinérgica sobre a indução de arritmias atriais de ratos jovens, infantes e neonatos. Sendo assim, entendemos que a metodologia adotada neste estudo foi abonada e qualificada pela literatura. Portanto, foi possível quantificar a eficácia e a potência de outros fragmentos de heparina (ARDE e NADRO), além dos anteriormente estudados por Duarte e cols, (2006).

O decaimento da força de contração da musculatura atrial foi claramente potencializada na presença de concentrações molares de ENOX (100 μ M). No que se refere ao relaxamento atrial, a

curva de decaimento mostrou que a ENOX foi capaz de acelerar o relaxamento quando comparado ao controle. Este efeito poderia ser decorrente, pelo menos em parte, da aceleração da extrusão do Ca^{2+} causado pelo aumento da atividade do TNC produzido pela ENOX. Esta proposta de que os fragmentos de heparina são capazes de diminuir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ já foi sugerida anteriormente por Shinjo (2002), a partir de experimentos em células musculares lisas vasculares obtidas por cultura celular. Portanto, os resultados aqui apresentados podem estar refletindo uma alteração na contração do músculo cardíaco, em resposta da ação da ENOX sobre o NCX. Isto novamente, corrobora a idéia de que os fragmentos de heparina são capazes de aumentar a atividade do NCX, acelerando a extrusão de Ca^{2+} dos cardiomiócitos. Outros estudos também sugerem que estes fragmentos de heparina podem agir sobre o NCX, presente na superfície da membrana plasmática, facilitando a extrusão do Ca^{2+} dos cardiomiócitos (Blaustein, 1989).

De forma similar ao proposto por Shinjo e cols (2002), verificamos também que, o efeito antiarrítmico correlaciona-se positivamente com o peso molecular dos fragmentos de heparina, pois os fragmentos com o maior peso molecular apresentaram um maior efeito antiarrítmico entre os fármacos testados.

Nossos resultados também mostraram que o efeito antiarrítmico da ENOX foi abolido pelo bloqueio farmacológico do NCX produzido pelo KB-R 7943. Isto vai novamente ao encontro a proposta da ação seletiva deste fragmento no NCX, conforme sugerido por Shinjo et al., (2002).

O NCX desempenha um papel decisivo na homeostase celular de Ca^{2+} e no controle do disparo de impulsos elétricos normais e anormais que controlam o mecanismo de excitação-contracção cardíaco (Bers, 2000). Apesar deste estudo não realizar a medida direta do efeito dos fragmentos de heparina sobre a homeostase celular de Ca^{2+} em cardiomiócitos, nossos resultados sugerem que, última análise, os fragmentos de heparina com características específicas dos fragmentos estudados, podem ter efeito antiarrítmico, provavelmente, por interagir com o NCX. Finalmente, evidenciamos em nossos estudos a interação dos fragmentos de heparina de forma direta sobre o NCX, governando sua atividade biológica. Assim, nossos estudos fornecem bases experimentais importantes para o desenvolvimento de drogas clinicamente úteis para o tratamento de arritmias cardíacas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que:

1. Concentrações molares de Ardeparina, Nadroparina e Enoxaparina foram capazes de bloquear as arritmias induzidas eletricamente em átrio direito isolado de rato, indicando que esses fármacos possuem atividade antiarrítmica,
2. A potência antiarrítmica dos fragmentos de heparina testados está relacionada com o peso molecular desses fármacos, pois a potência antiarrítmica da Ardeparina (7 kDa) foi maior em relação a da Nadroparina (5 kDa) e da Enoxaparina (4,5 kDa),
3. A ausência de efeito antiarrítmico dos derivados da heparina observada na vigência do bloqueio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) pelo KB-R 7943, confirma que este efeito antiarrítmico é ser mediado, pelo menos em parte, pelo aumento da extrusão do Ca^{2+} causada pela inibição da inativação do NCX,
4. Além das ações antiarrítmicas, os derivados da heparina também interferem na força de contração e no relaxamento da musculatura atrial, pois a Enoxaparina foi capaz de reduzir a força de contração e acelerar relaxamento da musculatura do átrio esquerdo de rato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTMAN, E.M.; COHEN, M.; MCCABE, C.; et al. Enoxaparin is superior to unfractionated heparin for preventing clinical events at 1-year follow up TIMI 11B and ESSENCE. **Eur Heart J.** v. 23, p. 308-314, 2002.

APPLEGATE, R.J. Vascular Closure Devices in Patients Treated With Anticoagulation and receptor Inhibitors During Percutaneous Revascularization. **J. Am. Coll. Cardiol.** p. 78-83, 2002.

BASSANI, J.W.M; GODOY, C.M.G.; BASSANI, R.A. Effect of ryanodine on sinus node recovery time determined in vitro. **Braz J Med Bol Res.** V.32, n.8, p. 1039-1044, 1999.

BASSANI, R.A, BASSANI, J.W. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. **Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 282(6):H2406-13, 2002.

BERS, D.M.. "Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction." **Circ. Res.** 87: 275–281. 2000.

BERS, D.M. Phospholamban decreases the energetic efficiency of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. **J. Biol. Chem.** V. 7, p. 195-201, 2001.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198-205, 2002.

BERS, D.M, GUO, T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. **An.n.Y. Acad Sci**, v. 1047, p. 86-98, 2008.

BERS, D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annv Re.. Phisiol.** v. 70, p. 23-49, 2008.

BERS, D.M, POGWIZD, S.M, SCHIETTHAUER.K. Upregulated Na^{+}/Ca^{2+} exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure. **Basic Res. Cardiol.** V. 97, p. 36-42, 2009.

BLAUSTEIN, M.P, LEDERER, W.J. Sodium/Calcium exchange: its physiological implications. **Physiol. Rev.** v.79, p.763-854, 1999.

BOYDEN, P.A. Cellular Electrophysiologic basics os cardiac arrhythmias. **Am J Cardiol**, v. 78, n. 4A, p. 4-11, 1996.

BONAZZOLA, P.; EGIDIO, P.; MARENGO, F.D.; SAVIO-GALIMBERTI, E.; PONCHE-HORNOS, J.E. Lithium and KB-R7943 Effects on mechanics and energetics of rat heart muscle. *V.* 176, p. 1-11, 2002.

CAIN, M. E. Electrophysiologic assessment of sinus node function. **Circulation**, v. 75, n. 3, p. 100-2, 1987.

CANADIAN COUNCIL on ANIAMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals. Disponível em: http://www.ccac.ca/English/gui_pol/guides/englishe/toc_v1.htm. Acesso em 10 de janeiro de 2004.

DÂNGELO, José Geraldo; FATTINI, Carlo Américo. **Anatomia humana sistêmica e segmentar: para o estudante de medicina.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, p.685, 2004.

DIETRICH, C.P.; SHINJO, S.K.; MORAES, F.A.; CASTRO, R.A.B.; NADER, H.B.; et al. Structural features and bleending activity of commercial low molecular weight heparins: neutralization by ATP and Protamine. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* v. 25, p. 43-50, 1999.

DUARTE, J.; CARICATI NETO, A.; GODOY, C.M.G. (2006). "Use of electrical stimulus strenght in rat atrium as parameter for *in vitro*. Quantification of drug anti-arrhythmic effect." In: FESBE 2006, Águas de Lindóia. Anais da FESBE 2006.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **AJP - Cell Physiology**, Vol 245, Issue 11-14, 1983.

FARIA. D.M.; VIVIANE, A.G.; GALVÃO, K.M.; CARICATI-NETO, A.; GODOY, C.M.G. Influence of age on inducibility and cholinergic modulation of arrhythmia in isolated rat right atria. AGE (Omaha), 2008.

FOZZARD, H.A., ARNSDORF, M.F. Cardiac electrophysiology. **The Heart and Cardiovascular System: Scientific Foundations.** New York, p. 63-98, 1991.

FROMM, M.F., KIM, R.B., STEIN, C.M. Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. **Circulation**, 1999, (99) 552-557.

GODOY, C. M. G.; BASANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. (1999). "Role of acetylcholine in electrical stimulation induced arrhythmia in rat isolated atria". **J. Cardiovasc Pharmacol**, v. 34, p. 475-479.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1821, 2006.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E.. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.973, 2002.

HILGEMANN, D.W. Regulation and deregulation of cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. **Nature**. v. 15, p. 242-245, 1990.

HOLD, R; HUBER, K; et al. Comparison of effects of dalteparin and enoxaparin on homeostatic parameters and von Willebrand factor in patients with unstable angina pectoris or non-ST- segment elevation acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**. v. 1, p. 589-592, 2002.

IRISAWA, H; BROWN, H.F.; GILES, W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. **Physiol. Rev**, v. 73, n. 1, p. 97-227, 1993.

KIM, M.H.; Trohman, R.G.; Eagle, K.A. (2003). "Low molecular weight heparin in atrial fibrillation management: facts, fiction, and future." **Card Electrophysiol Rev**.V.7, n.4, p. 397-400.

KIRCHHOF, P.; DEGEN, H.; FRANZ, M. R.; ECKARDT, L.; FABRITZ, L.; MILBERG, P.; LÄER, S.; NEUMANN, J.; BREITHARDT, G.; HAVERKAMP, W.(2003). "Amiodarone-induced postrepolarization refractoriness suppresses induction of ventricular fibrillation". **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 305, n. 1, p. 257-263.

KLABUNDE, R.E. Altered role of smooth muscle endothelin receptor in coronary endothelin-1 and adrenoceptor-mediated vasoconstriction in Type 2 diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 293, p. 2281-2288, 2007.

KRANIAS, E.G, BERS, D.M. Calcium and cardiomyopathias. **Subcell Biochem**, v. 45, p. 523-537, 2007.

LAMAS, G.A. et al. Ventricular pacing or dual-chamber pacing for sinus node dysfunction. **N Engl J Med**, v. 364, n. 24, p. 1854-62, 2002.

LEVINE, J.H., MOORE, E.N., KADISH, A.H. Mechanisms of depressed conduction from long-term amiodarone therapy in canine myocardium. **Circulation**, 1988, (79), 684-691.

MACIEL, R. Heparina de baixo peso molecular no tratamento da tromboembolia pulmonary. **J. Pneumol**. v. 28, p. 137-142, 2002.

MARTINEZ, R.B.; ISLA, J.A.; ALBERO. M.J.M. Heart failure mortality in Spain, 1997-1998. **Rev. Espanhola de Cardiologia**. v. 55, p. 219-226, 2002.

MASON, J.W. A comparison of seven antiarrhythmic drugs in patients with ventricular tachyarrhythmias. Electrophysiologic Study versus Eletrocardiographic Monitoring Investigatos. **New England. J. Med.**, 1993. (329), 452-458.

MATSUOKA, S.; NICOLI, D.A.; PHILIPSON, K. D. Regulation of cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger by the endogenous XIP region. **J Gen Physiol**. v. 109. p. 273-286, 1997.

MORADY, J.W. Radio-frequency ablation as treatment for cardiac arrhythmias. **New England. J.Med.** (340) 534-544.

NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Natiral occurrence and possible biological role of heparin, In: heparin: Chemical and Biological properties, clical applications. London, **Edward Arnold Publisher**, London, p. 81, 1989.

NETTER, F.H. The ciba collection of medical ilustrations: heart. 4° ed. Summit. EUA. **Ciba**, 5v.1978.

PRIORI, S.G., BARHAININ, J., HAUER, R.N., ET AL. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: Impact on clinical management. Study group on molecular basis of arrhythmias of the Working Group on arrhythmias of the European Society of Cardiology. **Eur. Heart J.**, (20), p. 174-195, 1999.

ROSS, A., WILLEMS, P.H. Synchronized Ca^{2+} signaling by intracellular propagation of Ca^{2+} action potentials in NRK fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol.** V. 273, p. 1900-1907, 1997.

SAFFITZ, J.E. The Molecular basis of anisotropy. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 6, p. 498-510, 1995.

SHINJO, S.K.; TERSARIOL, I.L.S., OLIVEIRA, V.; NAKAIE, C.R.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; SANTOS, I.A.A.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. (2002). "Heparin and heparan sulfate disaccharides bind to the exchanger inhibitor peptide region of Na^+/Ca^{2+} exchanger and reduce the cytosolic calcium of smooth muscle cell lines." **J. Biol. Chem.** V.50, n.277, 48227-48233.

TIMERMAN, A; CÉSAR, LAM; FERREIRA, JFM et al. **Manual de Cardiologia: SOCESP.** São Paulo: Atheneu, 2000. 590 p.

VEENHUIZEN, L. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D production in idiopathic hypercalciuria. **Child Nephrol Urol.** v. 11, p. 69-73, 2004.

YOUNG, E., WELLS, P.; HOLLOWAY, S. Ex-vivo and In vitro Evidence that low molecular weight heparins exhibit less binding to plasma proteins than unfractionated heparin. **Tromb Haemost.** V. 71, p. 300-304, 1994.

ZAFALON, N. J. "Taquiarritmia induzida por estimulação elétrica em átrio isolado de ratos: estudo de protocolo estimulatórios e mecanismos celulares". Campinas, 2001. 78p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade de Campinas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)