

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
TATIANA LIMA BOLETINI

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA ENOXAPARINA[®] SOBRE
O CRONOTROPISMO ATRIAL DE RATOS INFANTES**

Mogi das Cruzes, SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
TATIANA LIMA BOLETINI

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA ENOXAPARINA[®] SOBRE
O CRONOTROPISMO ATRIAL DE RATOS INFANTES**

Dissertação apresentada à Comissão de
Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica da Universidade de Mogi das
Cruzes, para obtenção do Título de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy

Mogi das Cruzes, SP

2010

FINANCIAMENTO



FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Boletini, Tatiana Lima

Caracterização do efeito da enoxaparina sobre o cronotropismo atrial de ratos infantis / Tatiana Lima Boletini. – 2010.

74 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy

1. Heparina - Fragmento 2. Arritmia 3. Eletroestimulação 4. Ratos infantis – Experimentos 5. Medicina experimental I. Godoy, Carlos Marcelo Gurjão de

CDD 619.93

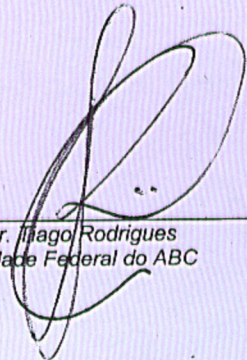
**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO MESTRADO
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

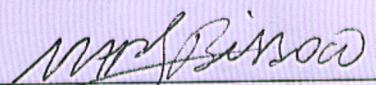
No dia 31/03/10 a candidata *Tatiana Lima Boletini*, após realizar os créditos exigidos, ser aprovada no exame de Proficiência em Inglês, e no exame de Qualificação, apresentou o trabalho "*Caracterização do efeito da enoxaparina sobre o cronotropismo atrial de ratos infantês*" para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Biomédica.

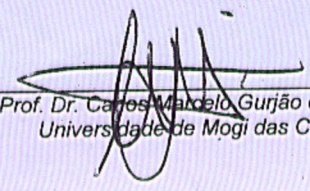
Os membros da banca consideram a candidata:

Dr. Tiago Rodrigues
Dr^a Marcia Aparecida Silva Bissaco
Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy

conceito
Aprovada
Aprovada
Aprovada


Prof. Dr. Tiago Rodrigues
Universidade Federal do ABC


Prof. Dr. Marcia Aparecida Silva Bissaco
Universidade de Mogi das Cruzes


Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy
Universidade de Mogi das Cruzes

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus por ser minha fortaleza,
ao meu marido Michel pelo incentivo, confiança,
amor e companheirismo e a minhas filhas
Tamyra e Raquel pelo amor, e compreensão
pela minha ausência em momentos necessários,
para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus* por ser fonte inesgotável de luz que ilumina e guia todos os meus passos, e por ter sido sustentação nestes anos de estudo que direcionaram a obtenção deste título.

“Na trajetória de nossas vidas, existem pessoas que deixam marcas profundas em nossas mentes e corações. Pessoas que em algum momento nos dedicaram carinho, atenção e nos transmitiram conhecimentos que jamais serão esquecidos. A estas pessoas, que considero especiais, gostaria de agradecer por estarem ao meu lado em momentos de alegria, conquistas, como também em períodos de cansaço e apreensão.”

Por isso agradeço,

Agradeço a minha grande família, em especial ao meu marido *Michel*, por todo amor, apoio e incentivo e as minhas filhas *Tamyra e Raquel*, pela abdicação de momentos importantes de nossas vidas, na execução desta dissertação.

De maneira especial, agradeço ao Prof. Dr. *Carlos Marcelo Gurjão de Godoy*, quem assumiu perfeitamente a sua tarefa de orientador, sempre com ética, dedicação, cumplicidade e amizade. Agradeço pela paciência, confiança, compreensão e por despertar dentro de mim a ciência, me ajudando assim a ser uma profissional e além de tudo uma pessoa melhor.

Aos meus pais, *Eliete e Carlos*, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. A vocês, o meu muito obrigado, pelo apoio e dedicação que me é dado até hoje.

À minha amiga *Adriessa*, por ser minha companheira em todos os momentos e por estar ao meu lado me apoiando e me ajudando sempre que precisei.

A *Marília*, por me ajudar e colaborar na fase final da realização desta dissertação.

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

A meus irmãos *Tayse e Fabrício* pela força durante estes anos.

A minha amiga *Renata* pela ajuda e colaboração nos momentos mais necessários.

Sou muito grata à Coordenadora do Curso de Pós Graduação Prof. Dra *Annie France Slaets* que soube me entender em todos os momentos difíceis.

Aos professores do programa de Engenharia Biomédica pelos ensinamentos.

Aos colegas do NPT (Núcleo de Pesquisas Tecnológicas).

A *Jéssica* pela sua amizade e eficiência.

A *Teresinha* por seu carinho.

A *Douglas* por cuidar do biotério com muita dedicação.

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento.”*

(Salomão, Provérbios 3 :13)

RESUMO

Alguns fragmentos de Heparina, como a Enoxaparina®, aceleram a remoção do cálcio intracelular via ativação do trocador sódio-cálcio (TNC), podendo ajudar no tratamento e/ou prevenção de arritmias causadas pela sobrecarga de cálcio intracelular em cardiomiócitos. Tendo em vista que a expressão do TNC muda com a idade, é esperado que o efeito destes fármacos também se modifique durante o desenvolvimento do animal. Assim, neste trabalho estudamos o efeito da Enoxaparina® sobre o cronotropismo – ritmo sinusal e arritmias – em átrio direito isolado de ratos infantis, e o comparamos com o obtido anteriormente em átrio de ratos adultos. Enoxaparina® foi adicionada, em diferentes concentrações, à solução de perfusão de cada átrio. Utilizamos trens de pulsos de 250 pulsos bipolares de tensão, 67 hertz, para indução de arritmias nas condições de ausência ou presença da Enoxaparina® na solução de perfusão. A amplitude de estímulo dos pulsos e a frequência atrial foram utilizadas como indicadores da inducibilidade de arritmias e do ritmo atrial, respectivamente. A eficácia antiarrítmica máxima da Enoxaparina® nos átrios de ratos infantis e adultos ocorreu para concentrações de 30 μM e 100 μM . O ritmo sinusal diminuiu em torno de 30% na presença de Enoxaparina®, em relação à condição de ausência deste fármaco na solução de perfusão, tanto para átrios de ratos adultos quanto infantis. Contudo, esta diminuição no ritmo se deu para concentrações uma ordem de grandeza menor nos infantis (5 μM no infante e 50 μM no adulto). A concentração de 50 μM de Enoxaparina® foi letal (parada sinusal seguida de morte) para átrios de ratos infantis. Estes resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, pelas alterações na expressão do TNC que são esperadas ocorrer com a idade do animal. Concluímos que a Enoxaparina® reduz o ritmo normal e tem efeito antiarrítmico atrial em ratos infantis em concentrações significativamente menores que em adultos, sugerindo que o fator idade deve ser cuidadosamente considerando na utilização clínica deste fármaco.

Palavras – chave: cronotropismo, Enoxaparina®, arritmias, infante.

ABSTRACT

Some fragments of heparin, such as Enoxaparin®, accelerate the removal of intracellular calcium via activation of sodium-calcium exchanger (NCX), which may help in the treatment and/or prevention of arrhythmias caused by intracellular calcium overload. Considering that the expression of NCX changes with age, it is expected that the effect of these drugs also changes during the development of the animal. In this work we studied the effect of Enoxaparin® on chronotropism- sinus rhythm and arrhythmias - in the isolated right atrium of infant rats, and compared it to what was previously obtained in adult rats. Enoxaparin® was added, in different concentrations, to the atrium perfusion solution. In order to induce arrhythmia, we used 250 bipolar voltage pulses (67 hertz) in the absence or presence of Enoxaparin®. The pulse stimulation strength and atrial rate were used as indicators of arrhythmia induction and sinus rhythm, respectively. The maximum antiarrhythmic effectiveness of the Enoxaparin® in infant and adult rat isolated right atria occurred in concentrations of 30 μ M and 100 μ M, respectively. The sinus rhythm decreased approximately 30% in the presence of Enoxaparin®, in relation to the condition of absence of this drug in the perfusion solution for both adult and infant atria. However, this atrial rate decreasing occurred at concentrations of an order of magnitude lower in infants (5 μ M in infant; 50 μ M in adult). The concentration of 50 μ A of Enoxaparin® was lethal (sinus rhythm nullification followed by atrial death) for infant atrial tissue. These results could be explained, at least in part, by changes in the expression of TNC that are expected to occur with the animal's age. We conclude that Enoxaparin® reduces the normal rate and has atrial antiarrhythmic effect in infant rats at significantly lower concentrations in relation to what occurs in adult rats, suggesting that age should be carefully considered for the clinical use of such a medicine.

Keywords: Chronotropism, Enoxaparin®, Arrhythmias, Infant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura anatômica do coração.....	18
Figura 2	Câmaras do coração de mamíferos.....	19
Figura 3	Desenho mostrando a condução da atividade elétrica do coração..	21
Figura 4	Potencial de ação nas fibras musculares cardíacas.....	25
Figura 5	Regulação do Ca^{2+} no músculo cardíaco.....	28
Figura 6	Esquema simplificado mostrando a condução do impulso cardíaco normal.....	31
Figura 7	Formação da reentrância durante a condução da atividade elétrica do coração.....	31
Figura 8	Estrutura química da molécula de heparina e do derivado da heparina ENOXAPARINA®.....	36
Figura 9	Foto da montagem experimental utilizada para átrio direito isolado.....	46
Figura 10	Foto da cuba de perfusão.....	47
Figura 11	Trem de pulso utilizado para induzir arritmia.....	49
Figura 12	Eletrograma registrado durante indução de arritmia atrial em átrio direito isolado de rato infante.....	53
Figura 13	Freqüências atriais de ratos infantes e adultos em função de diferentes concentrações de Enoxaparina®.....	58
Figura 14	Efeito das diferentes concentrações de Enoxaparina® utilizadas em átrios infantes e em átrios adultos sobre a amplitude de estímulo necessária para induzir arritmia.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Massas dos ratos infantis e dos seus respectivos átrios direitos isolados utilizados nos experimentos (N=42).....	42
Tabela 2	Caracterização da Indução de arritmias atriais em átrio direito isolado de ratos infantis (12 a 15 dias; N=5).....	54
Tabela 3	Parâmetros eletrofisiológicos da indução de taquiarritmia em átrio direito isolado de ratos infantis (12 a 15 dias), nas condições controle e tratado com diferentes concentrações de Enoxaparina®...	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bpm	Batimentos por Minuto
°C	Grau Celsius
Ca ²⁺	Íons Cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
CCVD	Canais de Ca ²⁺ voltagem-dependente
CO ₂	Dióxido de Carbono
EET	Estimulação Elétrica Transmural
ENOX	Enoxaparina®
g	Gramas
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
K ⁺	Íons Potássio
KH	Krebs Heineleit
kDa	Kilodáltons
LA	Limiar atrial
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mV	Milivolts
Na ⁺	Íons Sódio
NAV	Nódulo Átrio Ventricular
NPT	Núcleo de Pesquisas Tecnológicas
NS	Nódulo Sino-Atrial ou Sinusal
O ₂	Oxigênio
PA	Potencial de Ação
PKA	Proteína Kinase A
RyR	Receptor de Rianodina
RS	Retículo sarcoplasmático
TNC	Trocador sódio e cálcio
μM	Micro molar
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	17
1.1.1	Atividade Elétrica Cardíaca.....	20
1.1.2	Fenômeno do Potencial de Ação.....	22
1.1.3	Acoplamento Excitação - Contração.....	26
1.2	ARRITMIAS CARDÍACAS.....	29
1.3	TRATAMENTO DAS ARRITMIAS.....	32
1.4	PAPEL DAS HEPARINAS E SEUS DERIVADOS SOBRE O TRANSPORTE DE Ca^{2+}	34
1.5	AÇÃO DE DERIVADOS DE HEPARINA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	37
1.6	ARRITMIAS NA INFÂNCIA.....	38
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	OBJETIVO GERAL.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	ANIMAIS.....	41
3.2	SOLUÇÃO FISIOLÓGICA.....	43
3.3	PREPARAÇÃO DO ÁTRIO PARA OS EXPERIMENTOS DE INDUÇÃO DE ARRITMIA.....	43
3.4	MONTAGEM EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE ARRITMIAS CARDÍACAS.....	44
3.5	FÁRMACOS.....	48
3.6	PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE ARRITMIAS ATRIAIS.....	48
3.7	ANÁLISE DE DADOS.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE ARRITMIAS ATRIAIS EM ÁTRIO DIREITO ISOLADO EM ANIMAIS INFANTES.....	52
4.2	EFEITO DA ENOXAPARINA®	55
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares, incluindo as arritmias cardíacas, são as principais e a primeira causa de morte no mundo, sendo 15 milhões de morte por ano, correspondendo a 30% do total de óbitos mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Somente a Doença Arterial Coronariana foi responsável por 33% das mortes no mundo (vide revisão de ALVES & MARQUES, 2009) e, no Brasil, a mortalidade devido a esta doença oscila entre 2,5 a 11,3 óbitos por 100 mil habitantes homens, entre 45 a 55 anos (WORD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Não menos importantes são as arritmias cardíacas – que são anormalidades na origem e/ou distúrbio na condução da atividade elétrica do coração – as quais podem afetar drasticamente a atividade mecânica de bombeamento de sangue do coração, podendo causar inclusive um elevado número de óbitos (GOLDSTEIN *et al.*, 1995; GOLDBERGER, 1999; A. H. A, 2004)

Visando reduzir a mortalidade resultante das arritmias cardíacas, procedimentos terapêuticos são necessários para impedir o desenvolvimento das disfunções cardíacas que levam às arritmias. Normalmente as arritmias cardíacas são tratadas através de três abordagens distintas: farmacológica, eletroestimulação e procedimentos cirúrgicos. Os tratamentos de arritmias realizados por eletroestimulação são utilizados para cessação forçada das arritmias, enquanto que os tratamentos realizados por fármacos antiarrítmicos são paralelamente utilizados para prevenção, dependendo do perfil do paciente e, particularmente, do perfil específico da arritmia.

Os fármacos antiarrítmicos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação a nível molecular, celular e tecidual. Por exemplo, o propranolol e seus análogos, como o atenolol, são usados como antiarrítmicos por serem capazes de reduzir a despolarização do marca-passo sinusal devido ao bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos cardíacos (PRIORI *et al.*, 1999). Podemos citar também a flecainida (bloqueador de canais de sódio voltagem-dependente) e o verapamil (bloqueador dos

canais de cálcio voltagem-dependente, tipo L) que possuem ação antiarrítmica 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 antiarrítmico (PRIORI *et al.*, 1999).

Embora os fármacos mencionados sejam eficazes no tratamento medicamentoso dos vários tipos de arritmias cardíacas, os mesmos possuem muitos efeitos colaterais ou tóxicos indesejáveis, como o efeito inotrópico negativo (diminuição da força de contração) e/ou efeitos cronotrópicos positivos (taquiarritmias) e negativos (bradicardia) (MANSON, 1993), sugerindo que novos fármacos precisam ser estudados para a melhora da eficácia nos tratamentos de alterações no ritmo do coração.

Especificamente no caso do cronotropismo - que é a modificação que ocorre no tempo de contração cardíaca, podendo ser devida a diversos fatores, tais como idade ou fármacos - há duas características cardíacas fundamentais a serem consideradas, sendo uma normal (a autorritmicidade) e outra patológica (a inducibilidade de arritmias). A autorritmicidade é normalmente avaliada pela frequência cardíaca, enquanto que a inducibilidade de arritmias é normalmente avaliada por meio de parâmetros relacionados à capacidade de indução de arritmias por eletroestimulação e/ou fármacos.

Recentemente alguns estudos apontaram que os fragmentos derivados da heparina, como a Enoxaparina[®], podem ser úteis no tratamento de alterações cronotrópicas atriais, especificamente a fibrilação atrial, devido a sua ação antitrombótica (KIM *et al.*, 2003), sem descartar contudo a possibilidade de que os fragmentos de heparina podem interferir nos mecanismos envolvidos na gênese desta arritmia. Na mesma época, em estudos realizados com a Enoxaparina[®], foi verificado que seu uso está associado a uma redução de 20% nos eventos clínicos durante a fase aguda do tratamento de pacientes com angina instável e infarto do miocárdio (ANTMAN *et al.*, 2002).

Por outro lado, estudos obtidos em células musculares lisas apontaram para a possibilidade de que os derivados da heparina reduzem a concentração de cálcio intracelular por meio do aumento da extrusão de cálcio, mediado pela ativação do Trocador Sódio e Cálcio – TNC (SHINJO *et al.*, 2002). A assertiva acima leva a

suposição de que a redução de cálcio intracelular produzida pelos fragmentos derivados da heparina em célula muscular lisa poderia também ocorrer em cardiomiócitos. Neste caso, o efeito de fragmentos de heparina poderia, em tese, reduzir a predisposição do tecido cardíaco ao desenvolvimento de arritmias por sobrecarga intracelular do íon Cálcio (Ca^{2+}).

De fato, esta hipótese vem sendo testada no Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca do Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT) da UMC, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy, em colaboração com pesquisadores da UNIFESP (Prof. Dr. Ivarne Luiz dos Santos Tersariol, Prof. Dr. Afonso Caricati Neto e Profa. Dra. Helena Bonciani Nader). A partir desta pesquisa realizada pelo Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca no NPT, foi verificado que os fragmentos de heparina são capazes de atenuar a inducibilidade de arritmias atriais (Duarte, 2006). Neste estudo experimental foi mostrado que, em concentrações de dezenas de micro molares, fragmentos derivados da heparina, como a Enoxaparina[®], são capazes de evitar a indução de arritmias por estimulação elétrica transmural (EET) em átrio direito isolado de ratos adultos.

Embora os mecanismos moleculares e celulares não sejam totalmente conhecidos, este estudo sugeriu que derivados de heparina poderiam ter efeito cronotrópicos importantes possivelmente por reduzir a concentração de cálcio intracelular via aumento da extrusão de cálcio, mediado pela ativação do TNC, similarmente ao proposto por SHINJO *et al.*, (2002) em músculo liso. Desta forma, os possíveis mecanismos cronotrópicos destes fármacos nas arritmias e no ritmo sinusal normal estariam envolvidos de maneira importante com suas ações sobre o TNC. Tendo em vista que, em animais mais jovens a expressão da atividade do TNC nos cardiomiócitos é maior do que a de animais adultos (ZAFALON, 2001), parece razoável esperar que o efeito cronotrópico destes fármacos se alterem em função da idade do animal.

Assim, visando aprofundar os estudos sobre o efeito cronotrópico de fragmentos de heparina, considerando as alterações que são esperadas ocorrer na atividade do TNC devido à idade, no presente estudo investigamos o efeito da Enoxaparina[®] sobre o

ritmo sinusal e sobre arritmias induzidas por estimulação elétrica transmural em átrio direito isolado de rato infante.

Apresentamos a seguir as bases teóricas relacionadas a este trabalho.

1.1 SISTEMA CARDIOVASCULAR

O coração compõe o sistema cardiovascular, que é considerado o principal sistema de integração do organismo. Este órgão é especializado em bombear sangue para os pulmões, órgãos e tecidos, levando nutrientes e removendo os produtos do metabolismo das células do organismo. Em seguida uma explicação sobre a fisiologia do sistema cardiovascular será elucidada com base em revisão bibliográfica de BERNE & LEVY, 2000; OPIE, 1998; DANGELO & FATTINI, 2004; BABSKY *et al.*, 1989.

Nos mamíferos, o coração é formado por musculatura cardíaca (miocárdio) de três tipos principais: músculos atriais, músculos ventriculares e fibras especializadas excitatórias e condutoras. O coração é internamente revestido pelo endocárdio e externamente pelo epicárdio, constituindo-se de quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos, que funcionam como duas bombas ligadas em série, que ejetam sangue para as circulações pulmonares e sistêmicas.

A circulação cardiovascular nos mamíferos (figura 1) ocorre da seguinte maneira: o sangue proveniente da circulação sistêmica chega ao átrio direito pela veia cava superior e inferior. Este sangue flui diretamente para o ventrículo direito devido à contração do átrio direito. O ventrículo direito, por sua vez, inicia a denominada circulação pulmonar, contraindo-se e bombeando o sangue para os pulmões, pelas artérias pulmonares, onde é feita a troca gasosa de CO₂ por O₂ (oxigenação sangüínea). O sangue rico em oxigênio, proveniente dos pulmões, flui para o átrio esquerdo do coração, via veias pulmonares fechando a circulação pulmonar. O sangue oxigenado proveniente dos pulmões flui para o ventrículo esquerdo com auxílio da contração do átrio esquerdo. O ventrículo esquerdo, por sua vez, bombeia o sangue, via artéria aorta, para todo o corpo, iniciando a chamada circulação sistêmica. A

circulação sistêmica finaliza-se com o sangue retornando ao átrio direito do coração, pelas veias cava superior e inferior.

A comunicação entre as câmaras atriais e ventriculares é feita através de válvulas presentes no septo atrioventricular , que se abrem e fecham de acordo com o gradiente de pressão, como ilustrado na figura 2.

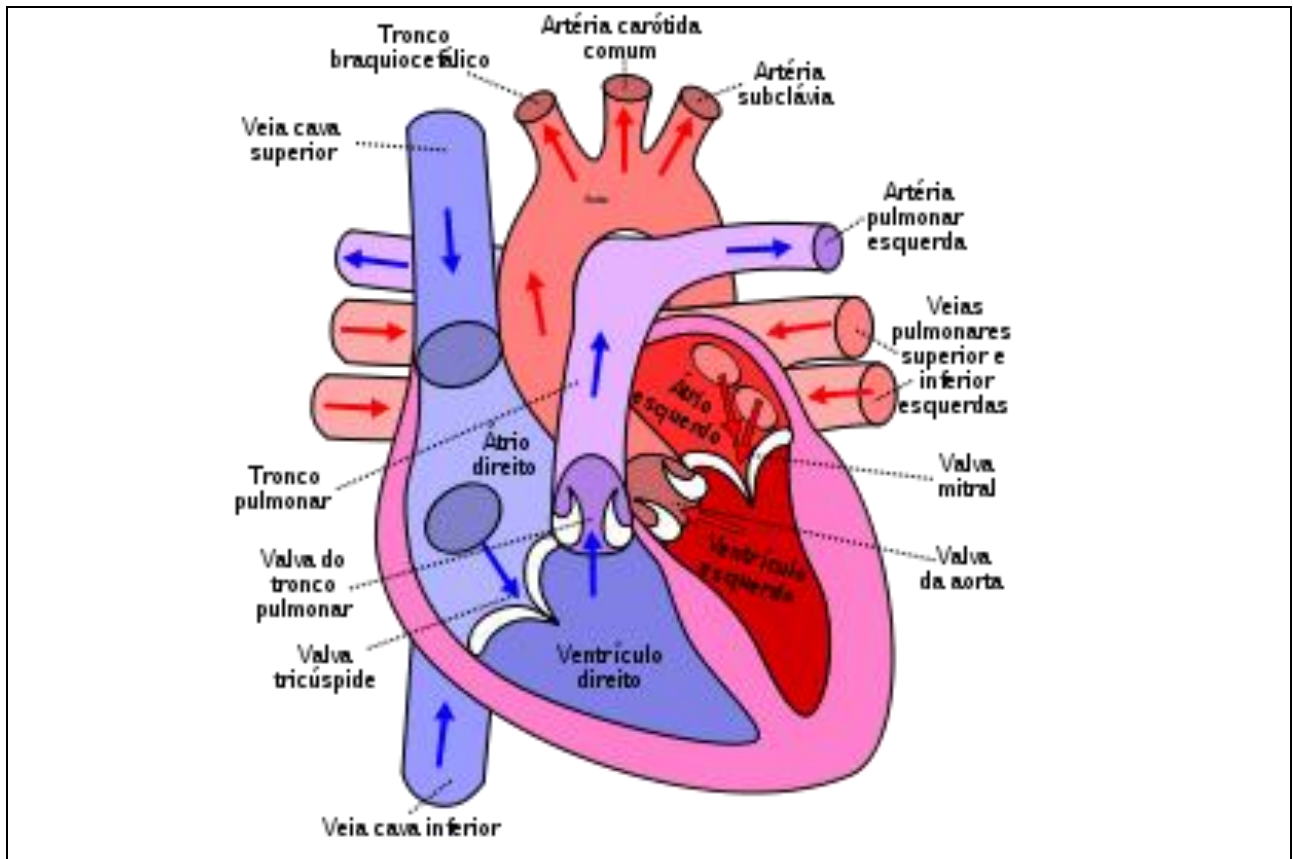


Figura 1: Estrutura anômica do coração. O coração mostrando a seqüência do fluxo sangüíneo pelas câmaras cardíacas. O fluxo está indicado pelas setas, sendo que as setas azuis indicam sangue venoso e as vermelhas indicam o sangue arterial (modificado de GUYTON & HALL, 1997).

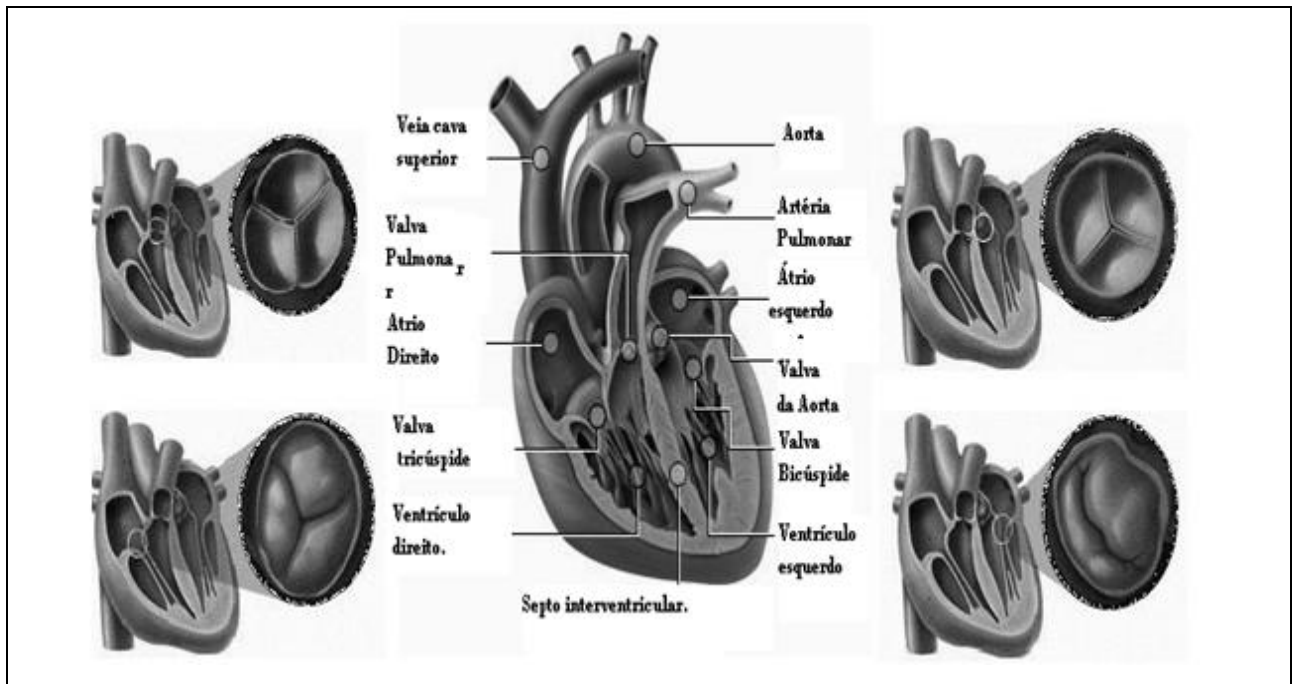


Figura 2: Ilustração das câmaras do coração de mamíferos. Nota-se que o coração apresenta 4 câmaras, sendo 2 átrios (direito e esquerdo) e 2 ventrículos (direito e esquerdo), septo interventricular que separa os dois ventrículos (direito e esquerdo) e duas válvulas muito importantes: a mitral ou bicúspide do lado esquerdo do coração; e a tricúspide que fica ao lado direito do coração (Modificado de H. GRAY, 1998).

A eficiência do bombeamento do coração requer atividade rítmica e coordenada dos átrios e ventrículos, segundo um padrão seqüencial de excitação e contração, regulando precisamente o volume sanguíneo ejetado em cada ciclo cardíaco. Para o perfeito funcionamento do coração, o tecido cardíaco conta com quatro propriedades fundamentais: contratibilidade; automatismo; excitabilidade e condutibilidade. A contratibilidade é a propriedade que o tecido cardíaco tem de se contrair em resposta a atividade elétrica gerada e conduzida no próprio tecido cardíaco. O automatismo é a propriedade que o tecido cardíaco tem de gerar espontaneamente e ritmicamente sua própria atividade elétrica. A excitabilidade é a propriedade que o tecido cardíaco tem de responder eletricamente a uma excitação elétrica ou mecânica. A condutibilidade é a propriedade que o tecido cardíaco tem de conduzir a atividade elétrica gerada por ele mesmo. A seguir esta descrita a condução da atividade elétrica no coração de mamíferos.

1.1.1 Atividade elétrica Cardíaca

A atividade elétrica do coração de mamíferos tem início no nódulo sinusal (NS), que é constituído por um conjunto de células cardíacas especializadas dotadas da capacidade de se despolarizar espontaneamente. Anatomicamente representado na figura 3, o nódulo sinusal está localizado na extremidade superior do lado externo do átrio direito, próximo a veia cava superior (CAIN, 1987).

A partir do disparo da atividade elétrica através do nódulo sinusal, esta se propaga pelo miocárdio atrial ativando a contração de toda a musculatura atrial, atingindo o nódulo átrio ventricular (NAV), onde há células do tecido especializado condutor dos ventrículos, representado pelo feixe de *His* e seus ramos e sub-ramos direito e esquerdo, terminando no sistema de *Purkinje* (figura3) e ativando a contração seqüencialmente de toda a musculatura ventricular do ápice a base do coração.

A atividade elétrica do coração constitui-se de potenciais de ação (PA). O PA é um fenômeno elétrico gerado e conduzido na membrana de células excitáveis,

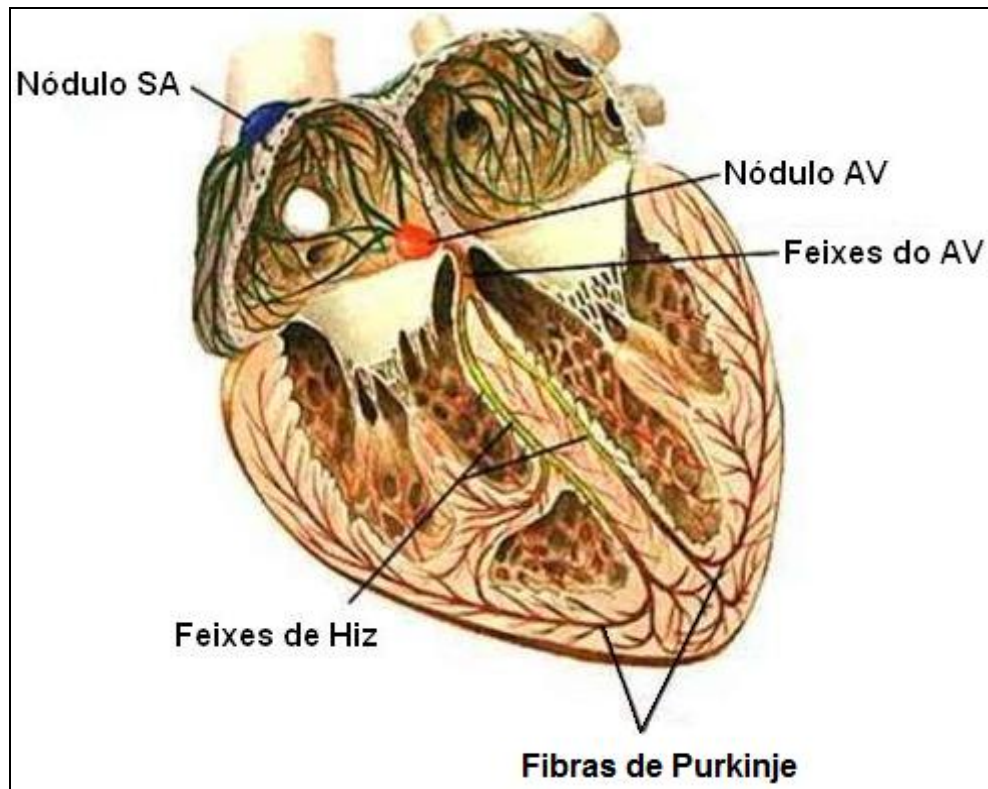


Figura 3: Desenho mostrando a condução da atividade elétrica do coração. Uma secção frontal do coração no qual exibe-se as estruturas relacionadas à gênese e à condução da atividade elétrica do coração (Modificado de JUNQUEIRA, 2005).

como os cardiomiócitos, a partir de um potencial de membrana (negativo no interior da célula) que não se propaga. O PA pode ocorrer na membrana celular das células miocárdicas devido à estimulação elétrica, sendo ela fisiológica ou não.

Embora as células miocárdicas sejam independentemente excitáveis, estas são interligadas por estruturas juncionais complexas (discos intercalados) em que se encontram conexões de baixa resistência (*gap junctions*). Este tipo de junção ocorre quando as membranas de células adjacentes estão muito próximas uma da outras. Entre as membranas de células adjacentes, existem canais transcelulares formados por conexinas, os quais permitem que a ativação elétrica de uma célula se propague para outra por meio do acoplamento espacial de correntes iônicas.

O processo funcional de disparo da atividade mecânica de bombeamento de sangue no coração pela atividade elétrica gerada pelo próprio coração é chamado de “acoplamento excitação-contração”. Para melhor compreender este processo, é necessário descrever o mais importante fenômeno do Potencial de Ação (PA) no cardiomiócito.

1.1.2 Fenômeno do Potencial de Ação

O PA consiste de uma variação rápida do potencial de membrana (despolarização) que ocorre a partir de um valor típico de -85 mV (no interior da célula) e se propaga na membrana da célula e de célula a célula. Durante o PA ocorre rápida despolarização da membrana seguida, após certo período, do retorno ao potencial de repouso (figura 4). O PA possui cinco fases que resultam de diferentes correntes iônicas que atravessam a membrana celular (VOLDERS *et al.*, 2000). A membrana das células excitáveis tem sua permeabilidade à passagem de íons alterada ao ser estimulada com intensidade superior ao seu limiar de excitabilidade. O PA resulta basicamente da diferença entre as correntes iônicas de entrada (despolarizantes) e as de saída (repolarizantes) que ocorrem ao longo do tempo.

Essas alterações na permeabilidade da membrana ocorrem devido à abertura, ao fechamento e à inativação de canais iônicos específicos principalmente para os íons

de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}). Quando há uma diferença de concentração iônica entre os dois lados de uma membrana celular, o fluxo de íons através da membrana, pelos canais iônicos, é afetado não apenas pelo gradiente de concentração, mas também pelo campo elétrico gerado através da membrana pelo movimento dos íons.

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).

Os potenciais de ação ocorrem de maneiras distintas nas diversas regiões corpóreas. No sistema cardiovascular, As fases típicas do PA (BAKER J.C *et al.*, 2000; LAMAS *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2008) são:

- Fase 0 (despolarização rápida) - decorre da entrada rápida de Na^+ na célula pela abertura dos canais de Na^+ voltagem- dependente (a concentração extracelular de Na^+ é maior que a intracelular). A maneira pelo qual o Na^+ se move através desses canais rápidos sugere que o fluxo é controlado por dois tipos de comportas em cada canal. Sendo um a comporta **m**(comporta de ativação) , a qual tende a ativar o canal á medida que V_m se torna menos negativo, a outra é a chamada comporta **h** (comporta de inativação), a qual tende a fechar o canal se o V_m se torna menos negativo.

- Fase 1 (repolarização precoce) - resulta da inativação dos canais de Na^+ e da abertura dos canais de potássio havendo um efluxo de K^+ (concentração extracelular de K^+ é menor do que a intracelular). A repolarização precoce ocorre devido a ativação de uma corrente transitória(I_{to}) para fora carregada principalmente de K^+ .

- Fase 2 (platô) - é mantida pela abertura de canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD) havendo assim um influxo de Ca^{2+} através do canal tipo L que se

contrabalança com o efluxo de K^+ (a concentração extracelular de Ca^{2+} é maior do que a intracelular).

● Fase 3 (repolarização lenta) - se dá pela inativação dos canais de Ca^{2+} e pelo aumento no efluxo de K^+ . Além dos canais de cálcio, a despolarização da célula favorece também a abertura dos canais de potássio retificadores tardios que são os principais determinantes da repolarização da célula. No final desta fase há uma diminuição abrupta do potencial transmembrana para o nível de repouso, que constitui a fase 4 do PA.

● Fase 4 (potencial de repouso) - se dá pela saída de K^+ , pelos canais de potássio (RIERA 2007).

As correntes iônicas que compõem os potenciais de ação registrados nos átrios e nos ventrículos, quando comparadas com as correntes iônicas que compõem os potenciais de ação do nódulo sinusal e atrioventricular, evidenciam haver papéis distintos destas correntes nas diferentes partes do coração. Diferente do que ocorre no tecido atrial e ventricular comuns, nos quais o PA é disparado de maneira rápida, há uma resposta lenta do PA no nódulo sinusal e atrioventricular, indicando que nos nódulos a deflexão inicial do PA na fase 0 é menos inclinada. Nos nódulos sinusal e átrio-ventricular, a fase 1 é ausente; o platô que ocorre na fase 2 não é sustentado; a repolarização na fase 3 é menos acentuada e o potencial de repouso na fase 4 também é ausente. As alterações decorridas podem ser explicadas pelo: 1- influxo de cátions monovalentes, principalmente Na^+ , induzindo pela hiperpolarização da membrana, 2- influxo de Ca^{2+} e 3- efluxo de K^+ .

Além das diferenças já citadas entre as células de respostas rápidas (átrios e ventrículos) e lentas (nódulo sinusal e átrio ventricular), algumas correntes predominam nos átrios, enquanto outras são mais prevalentes nos ventrículos (NASCIMENTO, 2008). Essas desigualdades refletem não apenas na morfologia do potencial de ação, mas também na ação de agentes antiarrítmicos.

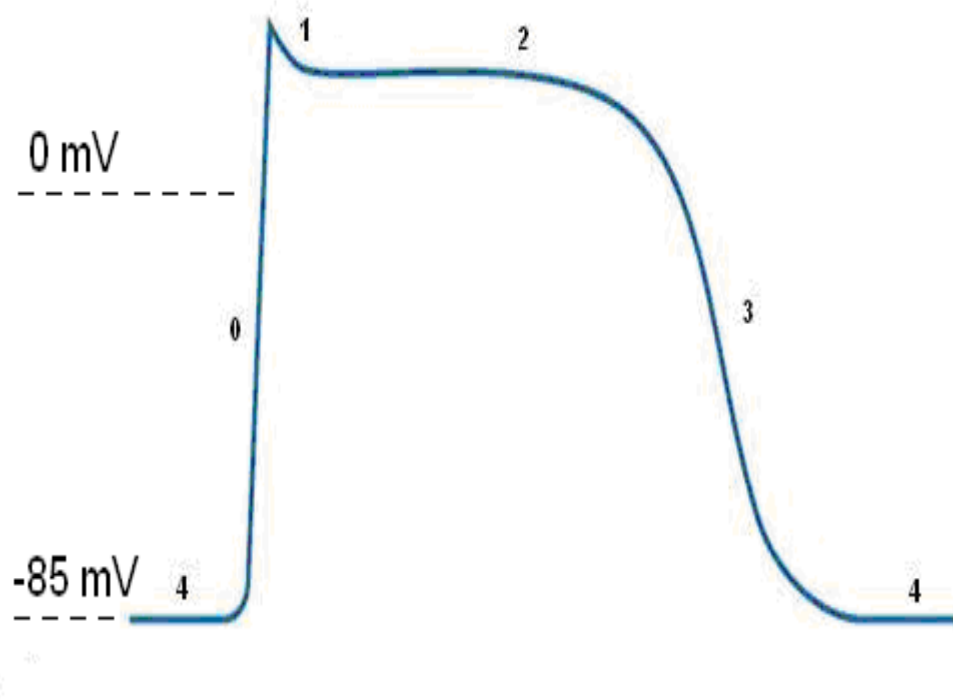


Figura 4: Ilustração de um potencial de ação nas fibras musculares cardíacas. Os números indicam as 5 fases do potencial de ação: 0: despolarização rápida; 1- repolarização precoce; 2: Platô; 3: repolarização lenta e 4: potencial de repouso (ver detalhes no texto) (modificado de BERNE 2000).

1.1.3 Acoplamento Excitação - Contração

Na fase 2 do PA (platô) o Ca^{2+} entra no cardiomiócito pelos canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) tipo L. Com a entrada do Ca^{2+} no cardiomiócito, é disparada a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) através dos receptores de rianodina (RZR) caracterizando um mecanismo chamado de “liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ”.

Com a entrada do Ca^{2+} no citosol, o Ca^{2+} que foi liberado pelo RS por receptores de RZR se interage à troponina C no aparato contrátil, iniciando a contração muscular (sístole). Este fenômeno é conhecido como “acoplamento excitação-contração” (BERS, 2001).

O relaxamento é feito com a remoção do Ca^{2+} do citoplasma. Isto é realizado por um sistema composto por Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (que transporta o Ca^{2+} para o meio extracelular); uniporter mitocondrial que transporta Ca^{2+} para o interior da mitocôndria (HENK. & PENELOPE, 2007).

Recaptação de Ca^{2+} via ATPase de Ca^{2+} (SERCA), que bombeia Ca^{2+} de volta para o RS regulada por sua interação com a fosfolambam, que é uma proteína moduladora presente na membrana do RS, que inibe a atividade da SERCA. Este sistema de captação de Ca^{2+} pelo RS é o mais potente dos mecanismos de redução de cálcio intracelular dos organismos dos mamíferos, seguido pelo TNC. Assim, as principais proteínas que participam da homeostase do Ca^{2+} no cardiomiócito são os CCVD tipo L, RZR e a SERCA, além do TNC (HENK. & PENELOPE, 2007).

Especificamente no caso do TNC, é sabido que trata-se de uma proteína capaz transportar Na^+ e Ca^{2+} através da membrana, atuando em células musculares esqueléticas, lisas e cardíacas. No músculo cardíaco o TNC é um importante regulador da contratilidade, fazendo a troca de íons, por transporte ativo secundário, ou seja, extrusão de uma molécula de Ca^{2+} em troca de três moléculas de Na^+ , permitindo assim, a diminuição da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e, conseqüentemente, o relaxamento dos cardiomiócitos (BERS, 2002). Um modelo da

participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos é mostrado na figura 5.

Dada sua importância, o envolvimento do íon de Cálcio (Ca^{2+}) na função contrátil do tecido cardíaco tem sido amplamente estudado há vários anos. Adicionalmente, há indícios na literatura que indicam haver uma série de arritmias cujo mecanismo parece estar ligado a processos celulares dependentes de Ca^{2+} (HENK & PENELOPE, 2007). Assim, a seguir abordamos aspectos teóricos relacionados às arritmias.

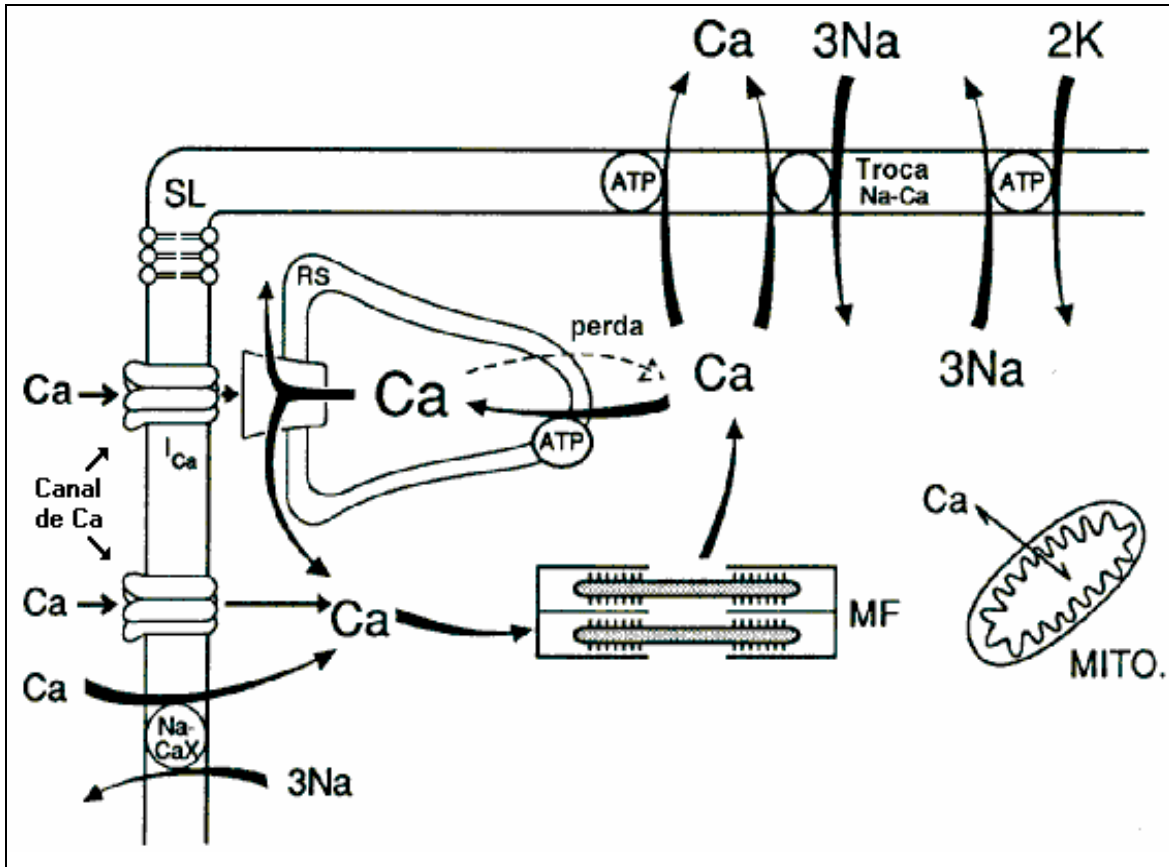


Figura 5: Ilustração da regulação do Ca^{2+} no músculo cardíaco. O Ca^{2+} pode entrar na célula via canais de Ca^{2+} voltagem-dependente (corrente de Ca^{2+}). A corrente de Ca^{2+} induz a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pela abertura do canal de liberação de Ca^{2+} presente na membrana do RS. O Ca^{2+} é removido dos miofilamentos e citoplasma principalmente pelo TNC presente no sarcolema e pela ATPase do RS (modificado de BERS, 2001).

1.2 ARRITMIAS CARDÍACAS

As arritmias cardíacas são anormalidades na gênese e/ou na condução da atividade elétrica do coração. Desta forma os mecanismos eletrofisiológicos geradores das arritmias cardíacas são classificados em três categorias: 1- distúrbio na formação da atividade elétrica , 2- distúrbio na condução da atividade elétrica, 3- distúrbio simultâneo da formação e condução da atividade elétrica (WALDO & WIT, 1993).

As arritmias provocadas por distúrbios na formação ou na condução podem se originar em uma única célula ou em um pequeno grupo de células conectadas anatômica e eletricamente. A propagação de um impulso cardíaco (PA) só é possível porque as células cardíacas são excitáveis, o que viabiliza que um estímulo natural ou artificial se propague por todo tecido celular.

O distúrbio na formação da atividade elétrica do coração pode ser gerado no próprio nódulo sinusal ou desenvolver-se em focos ectópicos, acarretando em impulsos elétricos em locais que não pertencem ao sistema normal de excitação cardíaca (APPLEGATE, 2000).

As arritmias causadas por distúrbio na formação da atividade elétrica, ou automatismo anormal, podem apresentar caráter incessante, muitas vezes de difícil controle farmacológico. Esse mecanismo parece implicar na gênese de algumas taquicardias atriais contínuas que ocorrem no coração estruturalmente normal, principalmente em crianças, e em algumas arritmias ventriculares na fase aguda do infarto do miocárdio (WALDO & WIT, 1993).

No que se refere ao distúrbio na condução da atividade elétrica, este consiste, essencialmente, de alterações na velocidade de condução do PA, podendo gerar bloqueios da ativação elétrica ou promover a gênese de reentrâncias. Os bloqueios ocorrem normalmente entre átrios e ventrículos podendo ser parciais, como: bloqueio 2:1 - a cada 2 ativações que chegam ao átrio-ventrículo , somente uma atinge os ventrículos; ou bloqueio total - a ativação atrial não passa para os ventrículos (ANTZELEVITCH, 2001). Esse fenômeno pode ser desencadeado por diversas doenças, como isquemia miocárdica, hipóxia e acidose.

A condução anormal é ainda um subsídio importante para a gênese de correntes de reentrância, sendo que enquanto os bloqueios ocorrem normalmente entre os átrios e ventrículos, podendo ser parciais ou totais, estas alterações ocorrem em regiões no tecido cardíaco cuja ativação elétrica é independente do nódulo sinusal, podendo ser estática ou não.

A reentrância, distúrbio da condução do impulso, é o mais freqüente, importante e bem estudado mecanismo causador de arritmias ventriculares e supraventriculares (WELLENS, 2001). Dizemos que há reentrância quando o impulso cardíaco, ao invés de se extinguir ao final da despolarização encontra um caminho de tecido excitável (fora do período refratário). Isto pode ocorrer por; 1- desenvolvimento de barreiras físicas que retardam ou bloqueiam a propagação da onda de despolarização; 2- diminuição do período refratário; 3- diminuição da velocidade de condução atrial (BERGER, 2007).

A figura 6 ilustra a condução do impulso cardíaco normal em uma ramificação na via de condução. Neste caso, a ativação atinge a ramificação, se propaga por ambos os ramos e segue seu fluxo normal descendente. As ativações que fechariam um circuito reentrante se anulam mutuamente. Por outro lado, reentrância (figura 7) ocorre desde que haja bloqueio unidirecional da atividade elétrica em um dos ramos perpetuando a reativação cíclica dos mesmos (BERGER, 2007). Isto pode ocorrer, por exemplo, devido a uma falha na condução em uma região isquêmica ou devido a uma recuperação não uniforme da excitabilidade (BERGER, 2007).

O distúrbio simultâneo da formação e na condução da atividade elétrica pode causar arritmias geradas no próprio nódulo sinusal, além do surgimento simultâneo de focos ectópicos e reentrâncias no tecido cardíaco como um todo.

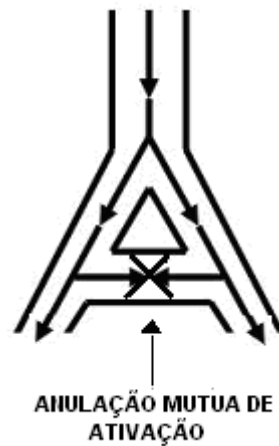


Figura 6: Esquema simplificado mostrando a condução do impulso cardíaco normal.

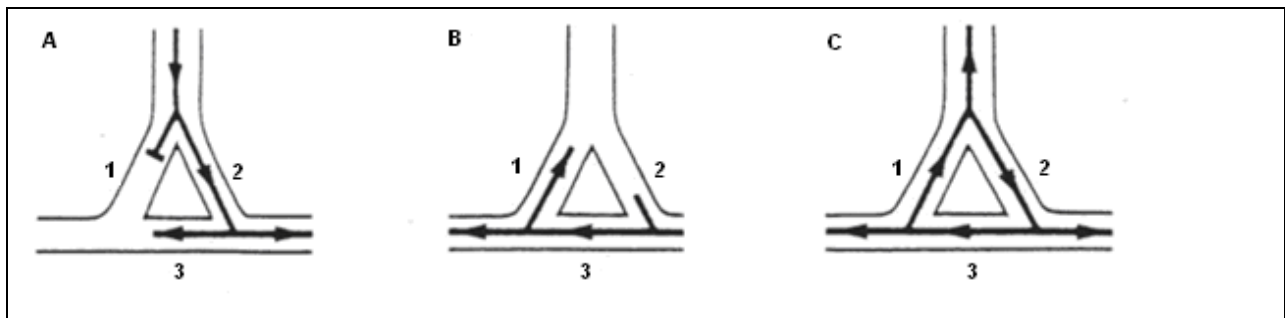


Figura 7: Formação da reentrância durante a condução da atividade elétrica do coração. (A), o impulso está bloqueado na via 1, sendo conduzido exclusivamente pela via 2 (bloqueio unidirecional). (B), o impulso segue pela via 3, atingindo retrogradamente a via 1. (C) ocorre caso a via 1 da figura A, onde ocorreu o bloqueio unidirecional, tiver recuperado sua excitabilidade. O impulso poderá retornar ao ponto de origem sendo assim novamente conduzido pela via 2, reentrando assim no circuito (modificado de NASCIMENTO *et al.*, 2008).

1.3 TRATAMENTOS DAS ARRITMIAS:

Técnicas Eletrofisiológicas e Farmacológicas

As técnicas eletrofisiológicas podem ser divididas em três categorias:

Técnica de estimulação programada: utilizada na avaliação da função do nóculo sinusal e do sistema de condução atrioventricular;

Técnicas de estimulação elétrica programada: utilizada para a indução e término de arritmias supraventriculares e ventriculares;

Técnicas de mapeamento: utilizada para se determinar as vias da taquicardia (DUARTE, 2006).

Além das técnicas de eletroestimulação artificial para indução e cessação das arritmias, existem testes com fármacos antiarrítmicos, no qual as concentrações necessárias dos fármacos dependem do paciente e particularmente do tipo específico da arritmia. Os fármacos antiarrítmicos são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação a nível molecular, celular e tecidual. De acordo com a classificação de Vaughn-Williams (VASCONCELOS *et al.*, 2003) os antiarrítmicos podem ser divididos em quatro classes: I, II, III, IV.

Os antiarrítmicos da classe I atuam através do bloqueio de canal de Na^+ , sem causar prolongamento do potencial de ação. O uso de antiarrítmicos da classe I está cada vez mais restrito em função dos efeitos pró-arrítmicos secundários que eles exibem. Porém, constitui-se de fármacos ainda úteis em situações individuais e específicas. São exemplos destes fármacos: quinidina, a qual possui pouca ação direta sobre o automatismo do nó sinusal normal, mas diminui o automatismo na fibra de Purkinje; a procainamida, a qual diminui o automatismo e aumenta o período refratário do potencial de ação. Outros exemplos são a mexiletina, moricizina e flecainida, que são apontados como responsáveis por elevações de limiar de desfibrilação (VASCONCELOS *et al.*, 2003)

Os antiarrítmicos da classe II são beta bloqueadores (beta-bloqueador β_1 seletivo, o practolol, carvedilol, bisoprolol e metoprolol) os quais atuam diminuindo a automaticidade do nódulo sinusal e não promovendo a alteração no potencial de repouso transmembrana, redução do tônus simpático por menor liberação de noreadrenalina, causando a diminuição do débito cardíaco. Temos como exemplo: propranolol e seus análogos, como o atenolol, que são usados como antiarrítmicos por serem capazes de reduzir a despolarização do marcapasso sinusal devido ao bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos cardíacos (FROMM *et al.*, 1999).

Os antiarrítmicos da classe III são bloqueadores de canais de K^+ , interferindo fundamentalmente na repolarização, fase 3 do PA. Pertencem a essa classe três drogas bastante distintas, a azimilide, amiodarona (bloqueador de canais de K^+) que também prolonga o potencial de ação nas células cardíacas produzindo efeito antiarrítmico; o sotalol, o qual está associado a efeitos eletrofisiológicos típicos das drogas pertencentes as classe II, com potentes propriedades betabloqueadores não-cardiosseletivas e o bretilio. (VASCONCELOS *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2006)

Os antiarrítmicos da classe IV são bloqueadores de canais de Ca^{2+} , como o Verapamil, o qual bloqueia os canais lentos de cálcio em todas as fibras cardíacas, reduzindo a fase do platô do potencial de ação, encurtando discretamente o potencial de ação nas fibras musculares e aumentando o potencial de ação nas fibras de Purkinje. O verapamil também aumenta o período refratário do nó AV tanto anterógrado quanto retrógrado, diminui a frequência do nódulo sinusal e, por consequência, reduz a velocidade de condução atrioventricular, caracterizando um efeito cronotrópico negativo. Este fármaco é amplamente utilizado no tratamento de arritmias supraventriculares (VASCONCELOS *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2006)

Existem ainda antiarrítmicos que possuem a capacidade de inibir o TNC, como por exemplo, o bepridil dronedarona, bloqueador de vários canais iônicos que inibe o influxo de Na^+ , Ca^{2+} e o Canal tipo L que é eficaz para tratamento de angina e de arritmia ventricular (WATANABE *et al.*, 2006).

Para que os fármacos antiarrítmicos sejam eficazes, é desejável que os mesmos interfiram de maneira adequada sobre o fluxo de íons através da membrana e no meio intracelular. No que se refere especificamente ao fluxo de Ca^{2+} , ainda há muito a se

elucidar acerca do modo apropriado de se atuar farmacologicamente. Por outro lado, conforme exposto anteriormente, as heparinas são capazes de reduzir a concentração intracelular de Ca^{2+} supostamente por ativar o TNC (SHINJO *et al.*, 2002), indicando que este tipo de fármaco poderia ter efeito antiarrítmico por atenuar arritmias relacionadas à sobrecarga de Ca^{2+} intracelular.

A seguir, abordamos o papel das heparinas sobre o transporte de Ca^{2+} .

1.4 PAPEL DAS HEPARINAS E SEUS DERIVADOS SOBRE O TRANSPORTE DE Ca^{2+}

Descoberta por McLean, a heparina é uma mistura heterogênea de glicosaminoglicanos ramificados, com peso molecular de 3.000 – 30.000 dáltons, que caracteriza-se por suas propriedades antitrombóticas. Após quase 90 anos de estudo BRINKHOUS (1939) demonstrou que a heparina é um anticoagulante indireto, já que pode ligar-se à proteína plasmática, proteínas liberadas de plaquetas e células endoteliais, resultando em resposta anticoagulante variável (YOUNG *et al.*, 1994; NADER & DIETRICH., 1989 & MACIEL, 2002).

Os derivados de heparina, também chamadas de “heparinas fracionadas” ou de “baixo peso molecular”, que representam cerca de um terço do tamanho da molécula, com peso molecular variando de 4.500 – 5.000 dáltons são derivadas da despolimerização química e enzimática da heparina (DIETRICH, 1989).

Estudos recentes demonstraram a hipótese de que a heparina e seus derivados podem interferir no tônus muscular dos vasos sanguíneos, através dos receptores presentes na superfície das células da musculatura lisa vascular, alterando assim as concentrações do Ca^{2+} citosólico. Estas alterações desempenham um papel fundamental na contração da musculatura lisa vascular, e a baixa concentração de Ca^{2+} no citosol reflete diretamente no equilíbrio entre o influxo e o efluxo de Ca^{2+} no citoplasma (ANTMAN *et al.*, 2002).

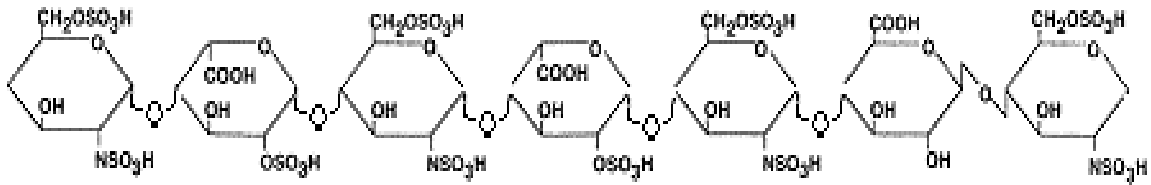
Sabendo que a membrana plasmática desempenha um papel importante para a entrada e saída de Ca^{2+} no citosol, SHINJO *et al.*, 2002 sugerem em seu trabalho que

derivados de heparina, agindo sobre o TNC, poderiam ter grande aplicabilidade clínica para o tratamento de arritmias cardíacas, isquemia, angina, hipertensão arterial e infarto agudo do miocárdio (SHINJO *et al.*, 2002). No mesmo período, outros estudos propuseram que os derivados da heparina, como a Enoxaparina[®], poderiam ser úteis no tratamento da fibrilação atrial devido a sua ação antitrombótica (KIM *et al.*, 2003), além de reduzir em 20% os eventos clínicos durante a fase aguda do tratamento de pacientes com angina instável e infarto do miocárdio (ANTMAN *et al.*, 2002). As diferenças entre as atividades biológicas de heparina e seus derivados podem ser explicadas pelo tamanho de sua molécula (ANTMAN *et al.*, 2002) e 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.

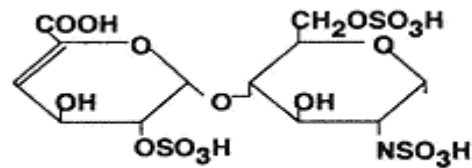
O TNC possui dois mecanismos de regulação chamados de regulação *11* e *12*, que ocorre tanto nos tecidos cardíacos como nos vasos sanguíneos. Na regulação *11* a atividade da troca decai para um estado de equilíbrio estático após o aumento da concentração intracelular de Na^+ . Esta regulação é mediada pela região da molécula do TNC denominada “Exchange Inhibitor Peptide (XIP)”. Já a regulação *12* ocorre quando a concentração de Ca^{+2} citoplasmática é reduzida para valores abaixo de 100 nM. Quando a concentração de Ca^{+2} citoplasmática se eleva acima de 300 nM, a ligação do Ca^{+2} ao trocador inibe o processo de inativação dependente do TNC, ativando assim a troca (HIRSH & RASCHKE, 2004).

Quando comparada com as heparinas não fracionadas, os derivados de heparina alcançam controle e eficácia mais precisa devido ao tamanho de sua molécula (ANTMAN *et al.*, 2002), como demonstrado no trabalho de SHINJO *et al.*, (2002), em que a presença do derivado de heparina, dissacarídeo trissulfatado, diminuiu em 50% o Na^+ extracelular, sugerindo que essa molécula poderia agir no TNC promovendo a extrusão de Ca^{+2} .

Na figura 8 ilustra-se a estrutura química da molécula de heparina não fracionada, e uma molécula derivada de heparina, a Enoxaparina[®].



HEPARINA



ENOXAPARINA

Figura 8 : Estrutura Química da molécula de Heparina e do derivado da Heparina ENOXAPARINA® (Modificado de DIETRICH *et al.*, 1999).

1.5 AÇÃO DE DERIVADOS DE HEPARINA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Os mecanismos pelos quais fragmentos de heparina, incluindo a Enoxaparina[®], reduzem os níveis do cálcio (Ca^{2+}) intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ainda não foram completamente compreendidos, porém existem várias evidências de sua ação sobre estoques intracelulares de Ca^{2+} , bloqueio no influxo da Ca^{2+} por CCVD tipo L e outros mecanismos envolvidos na homeostase celular desse íon. Seus efeitos hemodinâmicos resultam em parte, de sua ação sobre as células endoteliais e musculares lisas dos vasos sanguíneos. Esta ação vascular produz aumento do fluxo sanguíneo devido à redução da resistência vascular mediada pela vaso dilatação (SHINJO *et al.*, 2002).

Estudos com Enoxaparina[®] demonstram haver uma redução de 20% nos eventos clínicos de pacientes na fase aguda de anginas ou infarto do miocárdio (ANTMAM *et al.*, 2002). Neste estudo, nos qual os pacientes utilizaram Enoxaparina[®] durante um ano e verificaram sua eficácia em relação à da heparina não fracionada, verificou-se que os derivados de heparina resultam em um melhor tratamento em relação à heparina não fracionada.

Pacientes com disfunções cardíacas tratados com derivados de heparina apresentam baixa incidência de fibrilação atrial (KIM *et al.*, 2003). ANTMAN *et al.*, (2002) analisaram os benefícios significativos do tratamento da Enoxaparina[®] na revascularização de urgência e o infarto não fatal do miocárdio, sugerindo que os efeitos antiarrítmicos dos derivados de heparinas, como a Enoxaparina[®], poderiam ser resultantes de sua ação antitrombótica.

Entretanto, conforme mencionado no capítulo anterior, a redução do $[Ca^{2+}]_i$ produzida pelos fragmentos derivados de heparina em cardiomiócitos poderia reduzir a predisposição do tecido cardíaco ao desenvolvimento de alterações em seu cronotropismo, como por exemplo, na sua frequência espontânea e nas arritmias cardíacas resultantes de sobrecarga de Ca^{2+} .

1.6 ARRITMIAS NA INFÂNCIA

A fibrilação atrial é um tipo de arritmia atrial importante, acometendo cerca de 2 milhões de americanos e cerca de 6 milhões de pessoas em todo o mundo (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003). Em um estudo realizado na Inglaterra, verificou-se que 50% dos casos das mortes súbitas ocorridas entre crianças e adolescentes estão relacionados a arritmias cardíacas supraventriculares não diagnosticadas (WREN *et al.*, 2000).

As arritmias supraventriculares são as mais freqüentes na faixa etária pediátrica, necessitando muitas vezes de tratamentos farmacológicos ou cardioversão elétrica para sua interrupção (CAMARGO *et al.*, 1998). Seu diagnóstico é simples e pode ou não estar relacionado com sintomas clínicos mais graves, estando diretamente associado com complicações vascular cerebral (NARVAÉZ & NÚNES, 2000).

Estudos com arritmias cardíacas realizados em crianças e adolescentes é baseado no acompanhamento da atividade elétrica por períodos prolongados e/ou em testes de efeitos de drogas (DUBIN, 2000). Nestes diferentes métodos de estudo foi verificado que a cardioversão elétrica é o tratamento de primeira escolha para os recém-nascidos com diagnóstico de *flutter* atrial, sendo utilizado quando não for apresentado resposta à terapia com fármacos antiarrítmicos (DRAGO *et al.*, 1998). Contudo Wang *et al.*, (2000) verificaram que a taquicardia atrial em crianças de até 10 anos é bem controlada com drogas antiarrítmicas. Estas pesquisas indicam a necessidade de mais estudos sobre a eletrofisiologia de corações jovens, principalmente no que se refere às arritmias.

No coração de mamíferos adultos, a maior parte do Ca^{2+} ativador da contração é proveniente do Retículo Sarcoplasmático (BERS, 2001). Contudo, há indicações na literatura de que a contribuição relativa de fontes extra e intracelulares de Ca^{2+} para a contração de miócitos cardíacos parece depender do estágio de desenvolvimento do animal (HUANG *et al.*, 2004). Com relação ao tecido cardíaco de mamíferos neonatos, observou-se uma diminuição no volume relativo do RS com relação ao de adultos

(BRETTE & ORCHARD, 2007), e aumento na expressão do TNC (HUANG *et al.*, 2004).

Considerando as diferenças na expressão do TNC que são esperadas ocorrer em função da idade do animal, parece razoável supor que efeitos cronotrópicos de fármacos que atuam sobre o TNC, como os derivados de heparina, possam se modificar com a idade do animal. Assim, dada a larga aplicação de clínica de fragmentos de heparina, especialmente a Enoxaparina[®], é importante e justificável que estudos experimentais mais aprofundados do efeito cronotrópico deste tipo fármaco sejam feitos considerando-se a idade do animal.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito cronotrópico de fragmento de heparina (Enoxaparina®) em átrio direito isolado de ratos infantis e compará-lo com o de adulto (obtido em trabalho anterior).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A- Caracterizar o protocolo de indução de arritmias por eletroestimulação em átrio direito isolado de animais infantes.

B- Caracterizar e quantificar em átrio direito isolado de ratos infantes:

(1) O efeito da Enoxaparina® sobre a frequência atrial normal.

(2) O efeito da Enoxaparina® sobre inducibilidade de arritmias atriais.

C- Comparar as caracterizações e quantificações acima com as de átrio direito isolados de ratos adultos (obtido de DUARTE, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Utilizamos ratos da linhagem Wistar, machos, com idade de 12 a 15 dias (infantes, N= 42). Esta faixa etária equivale à pré-adolescência em humanos.

Os ratos foram provenientes do biotério da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Os animais permaneceram até o momento da experimentação em ambiente com condições padronizadas de alimentação, hidratação, temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar 45% a 75% e duração de fotoperíodo no regime de 12 horas claro e doze horas escuro invertido.

Os animais utilizados foram pesados em uma balança comercial (Ramuza, Ind. Com. Balança Ltda., Santana de Parnaíba, SP, Brasil) antes de realizar os experimentos. Os animais eram manipulados com luvas de látex por se adaptarem ao cheiro e ao calor da mão com a luva, cessando rapidamente comportamentos de fuga ou luta, tornando-se progressivamente mais dócil em manipulações subsequentes, diminuindo assim o stress do animal.

Os animais foram alojados na sala do biotério em gaiolas de polipropileno medindo 50cm x 40cm (4 a 5 animais por gaiola), forrada com maravalha esterilizada. Os animais mais novos receberam leite materno e água acidificada (HCl 1N, pH = 3) para diminuir a proliferação de bactéria na água.

Na Tabela 1 apresentamos as médias das massas dos átrios e das massas dos ratos com idades de 12 a 15 dias (infantes).

Tabela 1: Massas dos ratos infantis e dos seus respectivos átrios direitos isolados utilizados nos experimentos (N= 42).

Animais Infantes	
Massa do rato (g)	34,92 ± 0,03
Massa do átrio (mg)	7,85 ± 0,07

Dados expressos como: média ± desvio padrão da média.

3.2 SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

Durante os experimentos, os átrios foram perfundidos com solução fisiológica de Krebs-Henseleit (KH), com a seguinte composição (mM): NaCl 126,4; KCl 4,6; KH₂PO 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 13,6; CaCl₂ 1,5; Glicose 11,11.

Esta solução fisiológica foi saturada com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂), sendo o pH da solução ajustado para 7,4 e a temperatura mantida constante a 36,5° C. O pH da solução foi medido por meio de pHmeter Q.400A (Quimis, São Paulo, SP-Brasil). Após preparada, a solução era armazenada e estocada na geladeira por um período máximo de 5 dias.

3.3 PREPARAÇÃO DO ÁTRIO PARA OS EXPERIMENTOS

De acordo com as normas internacionais para experimentação animal preconizadas pelo “CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE” (1993) e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisas em Animais Experimentais da Universidade de Mogi das Cruzes – UMC, segundo o número de protocolo 016/2009, os ratos foram eutanasiados por concussão cerebral e degolados para a realização da abertura da caixa torácica e remoção do coração. Para tanto, os pulmões foram deslocados de sua posição original para permitir o acesso ao coração. Logo em seguida o coração foi removido. Após a remoção, o coração foi imediatamente colocado em um bequer 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 do átrio direito. Todo procedimento foi realizado em no máximo 1 minuto. O

átrio direito, o qual apresenta atividade contrátil espontânea mantida pelo nódulo sinusal, foi usado nos experimentos para estudo do efeito da Enoxaparina® sobre o cronotropismo cardíaco.

O átrio direito isolado foi mantido em sistema de órgãos isolados contendo solução de KH saturada com carbogênio e mantida à temperatura constante de 36,5°C (figura 9).

Após a montagem, o átrio foi mantido por um período de 10 minutos para estabilização da preparação, o qual é suficiente para este propósito. Em seguida à estabilização, foi realizado o protocolo de indução de arritmias cardíacas na ausência ou na presença de Enoxaparina® na solução de perfusão do átrio.

3.4 MONTAGEM EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE ARRITMIAS CARDÍACAS

A montagem experimental utilizada para átrio direito isolado, contendo uma cuba cilíndrica de acrílico com base de vidro para banho maria. Dentro desta cuba foi colocado uma cuba de vidro menor, na qual o átrio direito podia ser perfundido com solução de KH (figura 10). A solução em que o átrio era perfundido era proveniente de um equipo bureta graduado. Dentro da cuba de perfusão menor havia dois eletrodos de platina utilizados para estimulação por campo elétrico (Estimulação Elétrica Transmural, EET). Estes eletrodos, posicionados diametralmente na cuba de perfusão, foram conectados a uma unidade de estimulação isolada (Grass, SIU5 – Stimulus Isolation Unit; Grass Inst.Div., Astro-Med Inc., W. Warwick, RI, USA) ligada a um estimulador elétrico de tensão (Grass S48 – Stimulador; Grass Inst. Div., Astro-Med Inc., W. Warwick, RI, USA). Três eletrodos de captação, de prata cloretada, sendo um de

referência e dois de captação, foram conectados a um amplificador diferencial (Word Precision Instruments, Inc.; Isso-DAM8).

O monitoramento do eletrograma atrial foi efetuado através de um osciloscópio digital (Tektronix, TDS-210). A solução da cuba manteve-se aquecida por uma bomba de circulação e aquecimento de água controlável (Gaymar Industries, Inc.; TP-500). Este sistema é 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. Os eletrogramas atriais foram armazenadas em um microcomputador (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 (AqDados® 7.02), sendo os registros analisados no programa AqDAnalysis® 7 (Lynx Tecn. Electr. Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

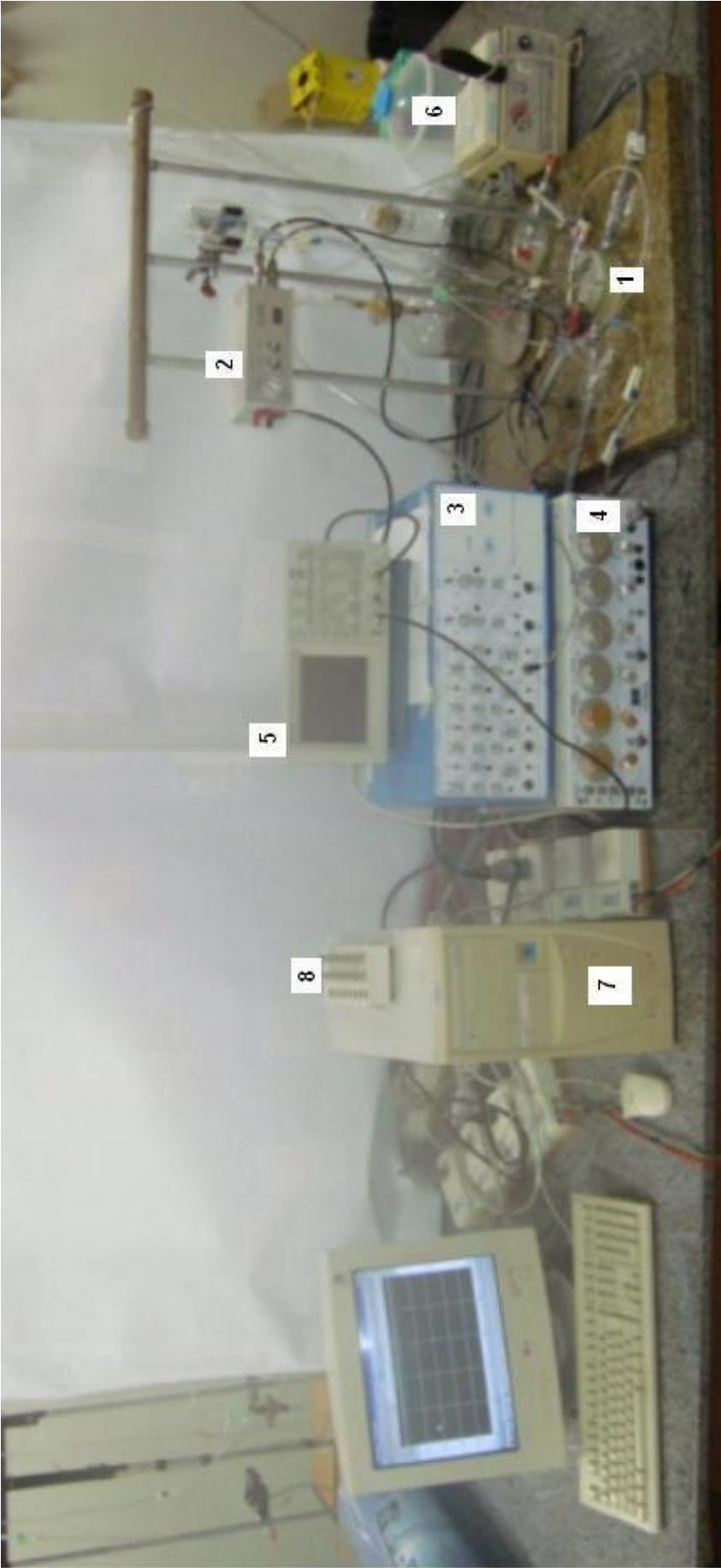


Figura 9: Foto ilustrando a montagem experimental utilizada para átrio direito isolado, contendo uma cuba de perfusão (1), unidade de estimulação isolada (2), amplificador diferencial (3), um estimulador elétrico de tensão (4), osciloscópio digital (5), uma bomba de circulação e aquecimento de água controlável (6), microcomputador (7), um programa de aquisição de sinal (8).

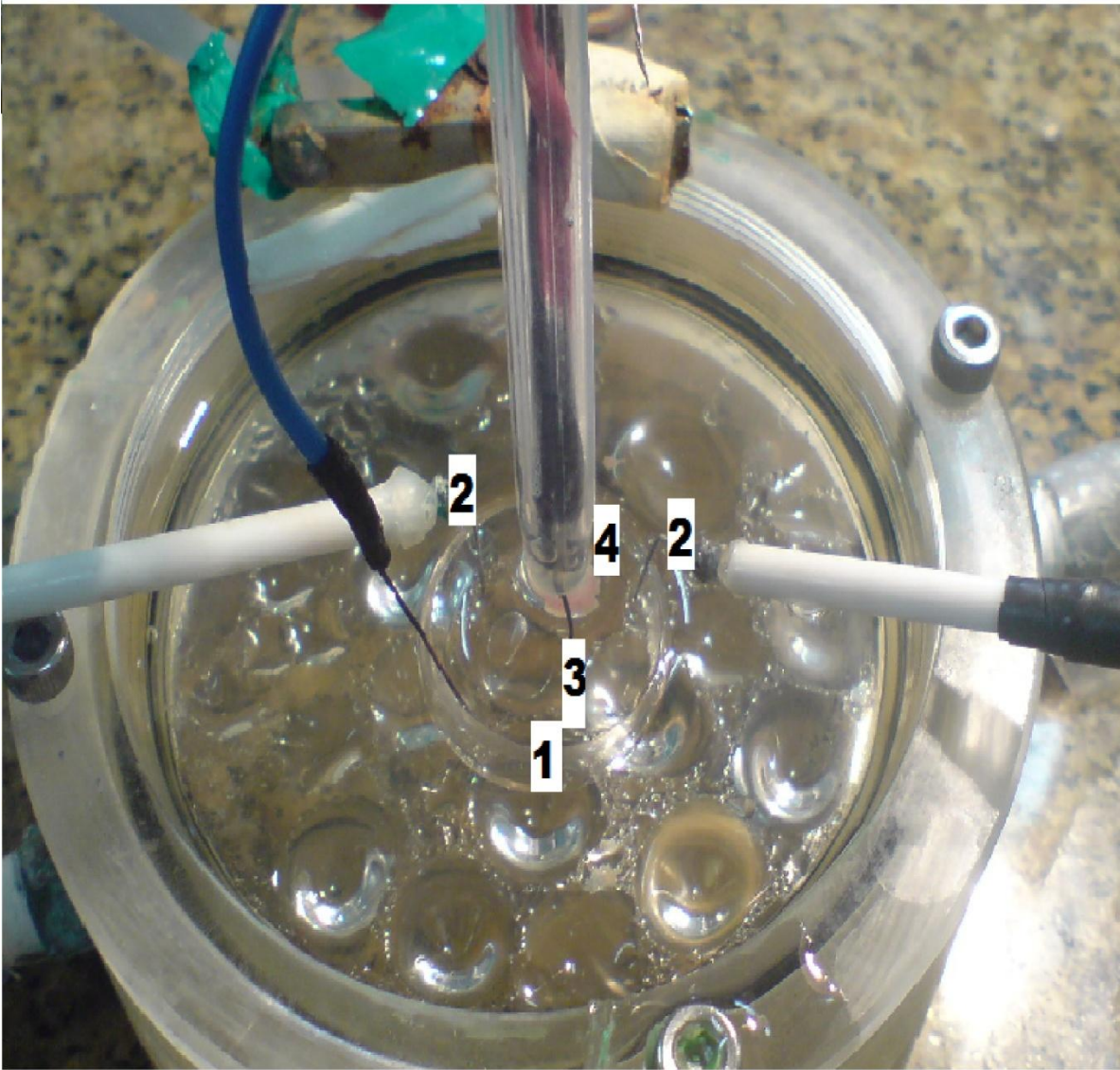


Figura 10: Foto da cuba de perfusão com a cuba menor (1) dentro, com 2 eletrodos de estímulo (2), com 2 eletrodos de captação (3) e o átrio direito isolado (4).

3.5 FÁRMACO

Utilizamos um derivado da heparina comercial, a Enoxaparina[®](CLEXANE), nas seguintes concentrações (μM): 5, 7, 30, 35 e 50. Este fármaco foi diluído a partir de soluções estoques mais concentradas até obtermos a concentração desejada diluída em 1ml de solução de KH para perfusão do átrio. Este fármaco foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol (CIIB-UMC).

3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE ARRITMIA

O protocolo de indução de arritmia atriais por Eletro Estimulação Transmural (EET) foi baseado em GODOY *et al.*, (1999). Este protocolo consiste da aplicação de um conjunto de até 6 trens de pulsos para indução de arritmia. Cada trem de pulso tem as seguintes características (figura 12) : 250 pulsos bipolares de tensão, 5 ms de duração em cada pulso, intervalo entre pulsos de 15 ms (frequência de 66,7 HZ) e intensidade de estímulo (amplitude) igual a duas vezes o limiar atrial (obtido imediatamente antes da aplicação do trem de pulsos) .

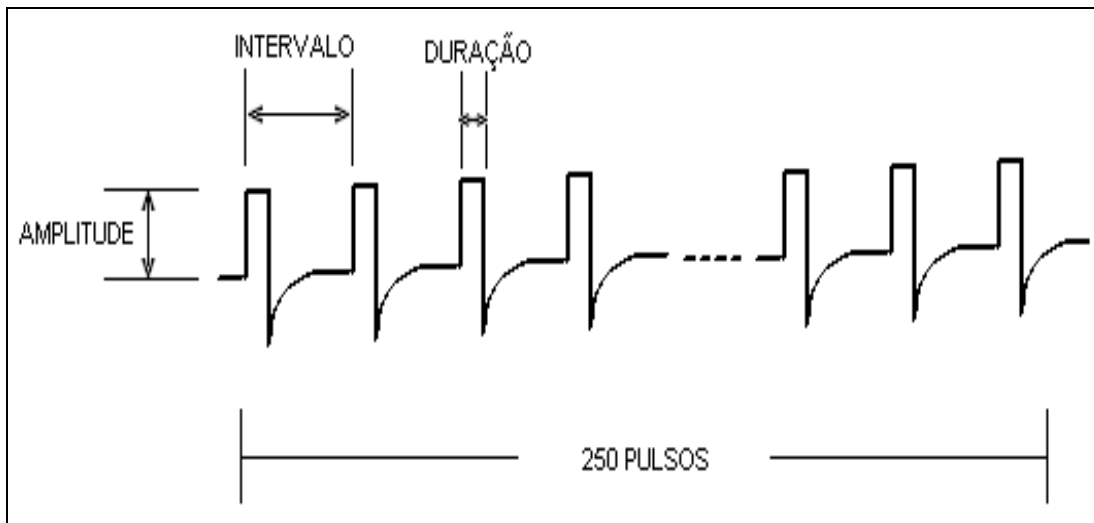


Figura 11: Ilustração do trem de pulso utilizado para induzir arritmia.

Numa tentativa de induzir taquiarritmia foram aplicados até 6 trens de pulsos com amplitude igual a 2x o Limiar Atrial (LA). Para identificar a ocorrência de taquiarritmia, foi utilizado o critério da presença da atividade elétrica atrial espontânea com frequência acima de 600bpm após o término do trem de pulsos.

Caso não houvesse a indução da taquiarritmia mesmo após a aplicação de 6 trens de pulso com amplitude igual a 2 x LA, a intensidade do estímulo era aumentada para 3x LA e uma nova tentativa de indução era feita com a aplicação novamente de até 6 trens de pulsos. O processo de aumento de amplitude de estímulo em unidades de L.A, a cada 6 trens de pulsos, era repetido até obtermos a indução de arritmia , ou até que atingíssemos a amplitude máxima do estimulador (tipicamente 12x L.A).

Em um primeiro momento, este protocolo de indução de arritmia foi utilizado para caracterizar a inducibilidade de arritmias em átrios de ratos infantis. Para isto, testamos a reprodutibilidade da indução por 3 vezes consecutivas, em intervalo de 10 minutos para cada reprodução.

Em um segundo momento, procedemos à utilização do protocolo de indução de arritmia aplicando-o nas seguintes condições:

- 1ª Tentativa na ausência de fármaco (controle);
- 2ª Tentativa na presença de fármaco (tratado);
- 3ª Tentativa após a remoção de fármaco (lavado).

A indução de arritmia foi realizada em intervalo de dez minutos em cada tentativa, sendo as três tentativas realizadas em um mesmo átrio.

Exceto no caso de parada e morte atrial, na terceira tentativa, foram reversíveis o efeito do fármaco com a remoção da Enoxaparina da solução de perfusão do átrio.

3.7 ANÁLISES DE DADOS

As frequências do ritmo normal e das arritmias, bem como a amplitude de estímulo necessário para indução de arritmia foram expressos como média \pm erro padrão da média.

As análises estatísticas destes dados foram realizadas com o uso do software GraphPad Instant (GraphPad software Inc5755 Oberlin Drive # 10, San Diego,CA 92121,USA). Este software (gratuito) viabiliza análise descritiva completa dos dados (média, desvio padrão, normalidade, etc.), bem como sugere a inferência estatística mais apropriada para a análise de variância (ANOVA). A hipótese nula (não há diferença estatisticamente significativa) foi rejeitada para valores de $P < 0,05$, utilizando ANOVA, com pós teste de TUKEY. A média de um determinado parâmetro obtido foi comparada entre o grupo controle e o grupo tratado.

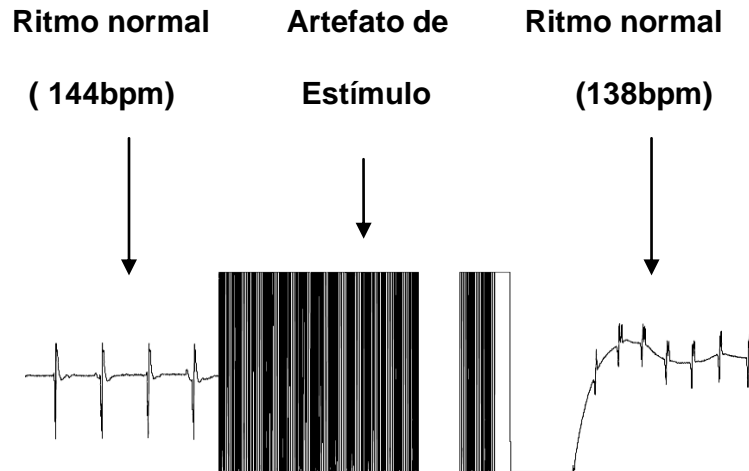
4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE ARRITMIAS ATRIAIS EM ÁTRIO DIREITO ISOLADO EM ANIMAIS INFANTES

Um eletrograma atrial típico obtido com a utilização do protocolo proposto por GODOY *et al.*, (1999). A partir deste protocolo fizemos a caracterização das arritmias em átrios direitos isolados de ratos infantis (figura 12). Observa-se na figura 12A um eletrograma no qual arritmia não foi induzida pelo protocolo que consistiu da aplicação de 6 trens de pulsos com amplitude igual a 3 vezes o Limiar Atrial (x LA). O registro mostrado é do 6º. trem de pulsos aplicado. Por outro lado, na figura 12B, observa-se que após a aplicação do protocolo induziu-se uma taquiarritmia (1000 bpm). Neste caso a arritmia foi induzida no 3º. trem de pulsos com amplitude de estímulo igual a 4 x LA. Estes registros expressam a dependência do sucesso de indução de arritmia com a amplitude do estímulo.

Na tabela 2 apresenta-se a caracterização completa da indução de arritmias atriais em átrio direito isolado de ratos infantis. As arritmias puderam ser induzidas em 3 tentativas consecutivas com intervalo de dez minutos entre as aplicações do protocolo completo. A amplitude de estímulo necessária para induzir arritmia foi de 4 vezes o limiar atrial. O número de trens de pulsos necessário para induzir arritmia variou de 3 a 6 trens de pulsos nas 3 tentativas. A duração das arritmias atriais variou de 1 a 120 segundos.

A



B

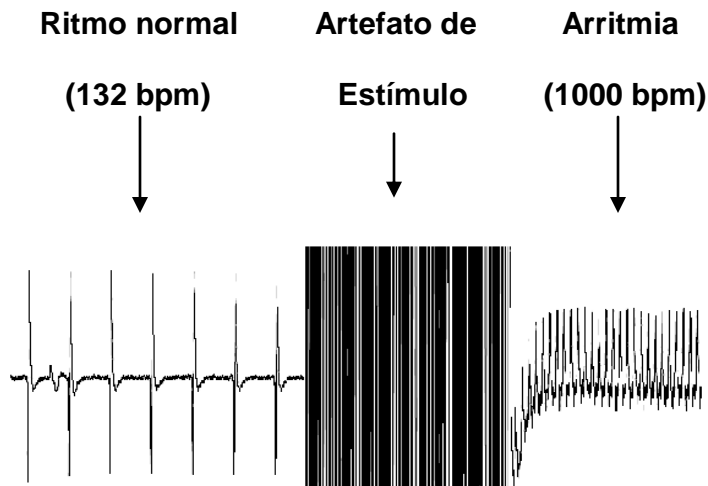


Figura 12 : Eletrograma registrado durante indução de arritmia atrial em átrio direito isolado de rato infante (12 a 15 dias). Observamos da esquerda para a direita na figura 4 A, o ritmo normal (frequência 144 bpm) que antecede o artefato de estímulo. Após o artefato observa-se o ritmo normal (frequência 138bpm). Na figura 4 B observamos da esquerda para direita, o ritmo normal (frequência 132 bpm), que antecede o artefato de estímulo. Após o artefato observa-se uma arritmia atrial, com frequência de arritmia de 1000 bpm, Esta arritmia durou mais de 30 segundos.

Tabela 2: Caracterização da Indução de arritmias atriais em átrio direito isolado de ratos infantis (12 a 15 dias; N=5)

	1 ^a .Tentativa de indução	2 ^a .Tentativa de indução	3 ^a . Tentativa de indução
Ritmo Normal (bpm)	114 ± 5	112±12	116±18
Amplitude do Estímulo (X Limiar atrial)	4	4	4
Número de Trens	4-6	3-6	5-6
Freqüência da arritmia (bpm)	870 ±60	930± 103	870±156
Duração da arritmia (s)	30 a >120	15 a >60	1 a 30

O ritmo normal é a freqüência exibida pelo átrio antes da aplicação de Estimulação Elétrica Transmural (EET) utilizada para indução de arritmia.

4.2 EFEITO DA ENOXAPARINA®

Na tabela 3 apresentamos o efeito da Enoxaparina® sobre os parâmetros eletrofisiológicos da indução de taquiarritmia em átrio direito isolado de ratos infantis, sem Enoxaparina® na solução de perfusão do átrio (grupo controle), e com a adição de Enoxaparina® em diferentes concentrações (grupo tratado). Apresenta-se a média do ritmo normal na ausência de Enoxaparina® (grupo controle) e na presença de Enoxaparina® (grupo tratado). Verificamos estatisticamente que as médias do grupo tratado são diferentes daquelas do grupo controle. Não foi possível induzir arritmia na condição de perfusão com 30 μM ou 35 μM de Enoxaparina® mesmo utilizando-se mais de 6 trens de pulsos com amplitude de 12x LA. Os átrios exibiram frequência nula após a aplicação do protocolo de estimulação com 35 μM de Enoxaparina® na perfusão, ou seja, não foi possível testar a inducibilidade na seguinte concentração.

Para maior clareza, na figura 13 apresenta-se gráfico que expressa o ritmo normal de átrios de ratos infantis em função das diferentes concentrações de Enoxaparina®. Para efeito de comparação, se expressa também neste gráfico o ritmo normal de átrios de ratos adultos, obtidos em trabalho anterior (DUARTE, 2006). O ritmo normal de átrio de ratos infantis diminuiu aproximadamente 35% (114 para 75 bpm) na presença de 5 μM de Enoxaparina®, em relação à condição de ausência deste fármaco na solução de perfusão. Esta diminuição ficou essencialmente em torno de 35% para as concentrações de 7 a 30 μM , aumentando para 55% (de 114 para 53 bpm) para a concentração de 35 μM de Enoxaparina®. Para a concentração de 50 μM de Enoxaparina® ocorreu parada atrial irreversível que levou à morte do tecido.

Para átrio de ratos adultos, o ritmo normal diminuiu em torno de 30% (de 275 para 185bpm) para uma concentração de Enoxaparina® de 50 μM , em relação à condição de ausência deste fármaco. Desta forma, há uma diminuição no ritmo normal em torno de 30% em átrio de rato infantis e de adultos, para concentrações de Enoxaparina® iguais a, respectivamente: 5 e 50 μM . Ou seja, o mesmo efeito sobre o ritmo atrial de ratos em diferentes idades foi obtido com uma diferença de concentração de uma ordem de magnitude na concentração do fármaco.

Ainda em átrio de ratos adultos, a queda no ritmo normal caiu aproximadamente 20% (de 275 para 220 bpm) em relação à condição controle (sem fármaco) para concentrações de Enoxaparina[®] entre 80 a 100 μM , enquanto que em átrio de ratos infantis observou-se quedas de até 55% no ritmo sinusal para concentrações menores (entre 7 e 35 μM).

Tabela 3 - Parâmetros eletrofisiológicos da indução de taquiarritmia em átrio direito isolado de ratos infantes (12 a 15 dias), nas condições controle e tratado com diferentes concentrações de Enoxaparina®.

	Controle (N=10)	5µM (N=8)	7µM (N=10)	30µM (N=10)	35µM (N=8)
Ritmo Normal (bpm)	114,16±5	75,43±8 *	74,40±6 *	68,40±4 *	52,79±3 *
Amplitude necessária para indução de arritmia (volts) Arritmia (x o Limiar atrial)	4	4	4	Não induziu Arritmia	Não induziu Arritmia
Frequência da arritmia (bpm)	870 ±60	886± 141	814± 128	-----	-----
Duração da Arritmia(s)	30 a >120	10 a 80	10 a >120	-----	-----

O ritmo normal foi registrado antes da aplicação de EET utilizada para indução de arritmia. Os *^{***} ilustrados na tabela indicam as médias estatisticamente diferentes da média na condição controle.

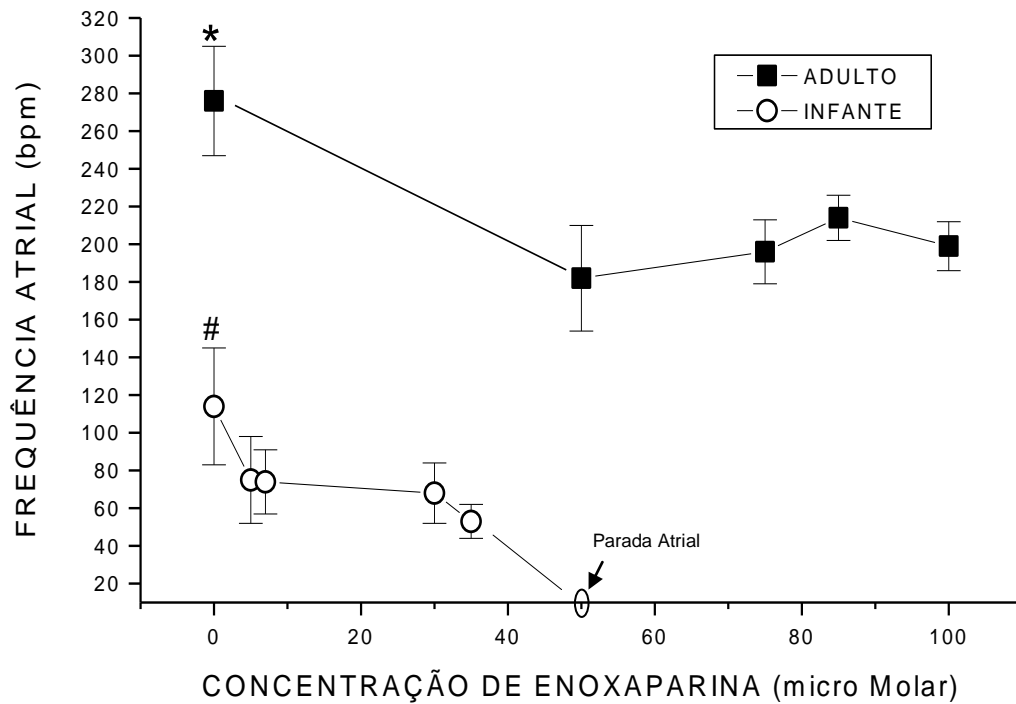


Figura 13: Frequências atriais de ratos infantes e adultos em função de diferentes concentrações de Enoxaparina®. O “*” mostrado na figura expressa a média dos ritmos normais do grupo controle de animais adultos, sendo estatisticamente diferente das médias dos grupos tratados com Enoxaparina®. O “#” mostrado na figura expressa que a média dos ritmos normais do grupo controle de animais infantes são estatisticamente diferentes da média do grupos tratados com Enoxaparina®. A “parada atrial” refere-se à concentração de 50µM na qual o átrio exibiu frequência nula seguida de morte. Dados expressos como: Média ± desvio padrão da média.

Para se induzir arritmia atrial na presença de Enoxaparina[®], foi necessário inicialmente verificar a caracterização da indução de arritmias atriais em átrio direito isolado de ratos adulto. Este dado já foi obtido no estudo feito por Duarte (2006) baseado no protocolo de GODOY *et al.*, (1999). Foi verificado que para se induzir uma arritmia em átrios direitos isolados de ratos adultos é necessário uma amplitude de estímulo equivalente a 2 x LA, enquanto que em animais infantis a amplitude de estímulo necessária para induzir uma arritmia é 4 LA.

Apresenta-se na figura 14 o efeito de diferentes concentrações de Enoxaparina[®] sobre a amplitude de estímulo necessária para indução de arritmia em átrio direito isolado de ratos infantis. Para comparação, apresenta-se também neste gráfico dados de átrio de ratos adultos obtidos de estudos de Duarte (2006) feitos anteriormente.

Não foi possível induzir arritmia na condição de perfusão com 30 μM de Enoxaparina[®] em átrios de animais infantis, ou com 85 μM a 100 μM de Enoxaparina[®] em átrio de animais adultos, mesmo aplicando-se mais de 6 trens de pulsos com amplitude de 12x o LA. Para a concentração de 35 μM de Enoxaparina[®], os átrios de ratos infantis sofreram parada de seu ritmo logo após a aplicação do protocolo de eletroestimulação, inviabilizando a caracterização da inducibilidade de arritmias.

A concentração de 50 μM foi ineficiente para evitar a indução de arritmia em átrio de ratos adultos, enquanto que para átrio de ratos infante este fármaco foi ineficiente para concentrações de 5 a 7 μM , ou seja, uma ordem de magnitude menor. Por outro lado, as menores concentrações para se obter efeito antiarrítmico em infantis e adultos foram, respectivamente, 30 e 85 μM .

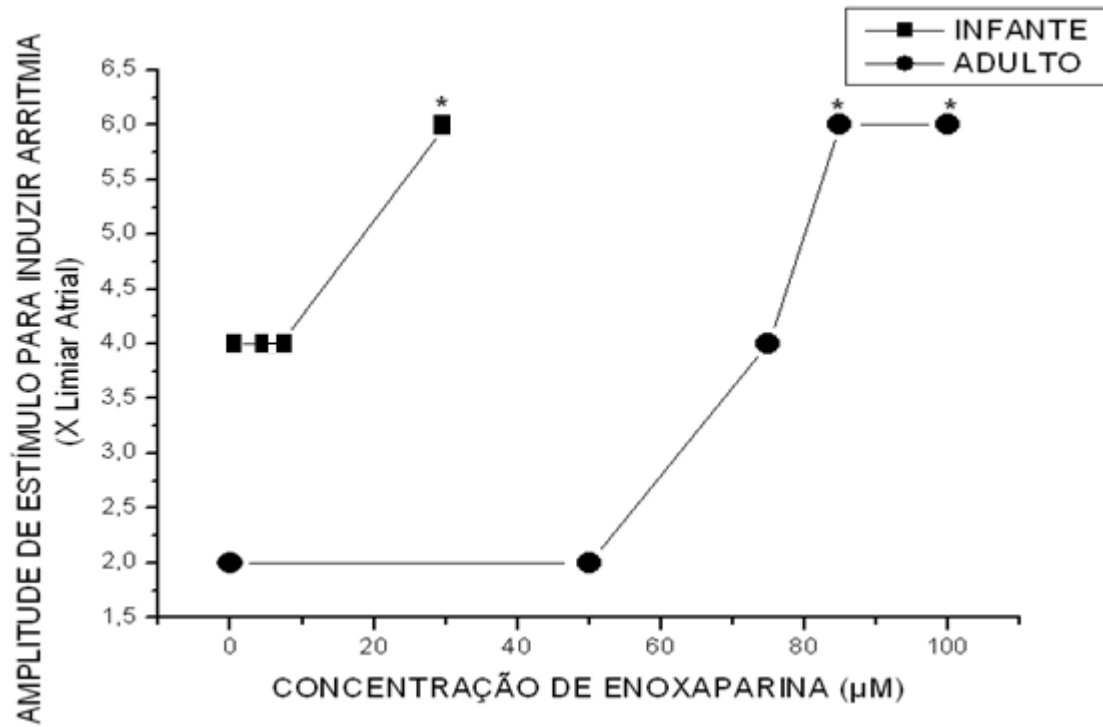


Figura 14: Efeito das diferentes concentrações de Enoxaparina® utilizadas em átrios infantis e em átrios adultos sobre a amplitude de estímulo necessária para induzir arritmia. O "*" mostrado no gráfico expressa que arritmia não foi induzida naquela condição (Efeito antiarrítmico máximo da Enoxaparina®).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado o efeito cronotrópico da Enoxaparina[®] sobre o tecido atrial de ratos infantês. Para isto caracterizamos o efeito de diferentes concentrações de Enoxaparina[®] sobre o ritmo normal e sobre a indução de arritmias em átrio direito isolado daqueles animais. Adicionalmente, para efeito de comparação, foi apresentado também o efeito da Enoxaparina[®] sobre o ritmo normal e a indução de arritmias atriais de ratos adultos obtidos em trabalho anterior (DUARTE, 2006).

No estudo atual foi verificado que a frequência atrial (FA) em ratos infantês é menor que a de ratos neonatos e adultos. Este resultado corrobora os achados de outros estudos que encontraram valores mais baixos para a frequência cardíaca de ratos infantês em comparação a de adultos (FARIA *et. al.*, 2009 & STAUSS *et.al.*, 1997).

A diminuição da FA em animais adultos, em relação a neonatos, é também observado na espécie humana. Em estudo feito em humanos do sexo masculino com idades de 0 a 14 anos, foi apontado tendência de aumento da atividade nervosa simpática, excitando o coração (aumentando a frequência cardíaca) até a idade de seis anos (PRADO, 2008). Contudo, conforme outros estudos feitos em humanos (GOTO *et al.*, 1997), após a entrada no período da pré adolescência e adolescência, foi verificado um declínio progressivo da frequência cardíaca relacionado à redução da atividade vagal sobre o coração. Adicionalmente, em estudos realizados em humanos adolescentes e adultos por MASSIN *e cols.* (2000) e MEERSMAN *e cols* (2006), verificou-se um significativo aumento da atividade nervosa simpática durante a fase adulta, em relação à fase da adolescência.

No estudo do efeito da Enoxaparina[®] em átrios de animais infantês visto neste trabalho foi constatado haver uma diminuição no ritmo normal atrial em todos os experimentos nos quais se adicionaram aquele fármaco. Similarmente, se verifica uma redução significativa do ritmo normal atrial em átrios de animais adultos, quando comparado ao do grupo controle (ausência de Enoxaparina[®]);(DUARTE, 2006).

Contudo, foi necessário utilizar concentrações de Enoxaparina® uma ordem de grandeza maior que a utilizada em infantes.

De maneira geral, para se obter efeitos cronotrópicos mensuráveis em átrio de animais infantes, foi necessário utilizar concentrações entre 5 e 35 μM , enquanto que em átrios de animais adulto foi necessário utilizar concentrações maiores (entre 50 e 100 μM). Vale ressaltar ainda que não foi possível estudar o cronotropismo em concentrações maiores ou iguais a 50 μM de Enoxaparina® em átrios de infantes, pois a frequência atrial caiu a zero naquela concentração, inviabilizando a finalização dos experimentos. Desta forma, estes resultados indicam que, assim como ocorre em átrio de ratos adultos, a Enoxaparina® também tem efeito cronotrópico em átrios de ratos infantes. Contudo, a eficácia cronotrópica deste fármaco se dá em concentrações significativamente menores em relação à dos adultos.

Como já visto em estudos de SHINJO *et al.*, (2002), a Enoxaparina® promove redução da concentração intracelular de cálcio em células musculares lisas, exibindo assim potencial para alterar o ritmo cardíaco. No presente estudo, foi verificado, tanto em átrio direito isolado de animais infantes como em átrios de animais adultos, que houve uma diminuição no ritmo atrial normal após a utilização da Enoxaparina®, corroborando a idéia de SHINJO *et al.*, (2002) que a Enoxaparina® pode afetar o ritmo cardíaco.

Em estudos realizados por DUARTE (2006) constatou-se o efeito de diferentes fragmentos de heparina, incluindo a Enoxaparina®, sobre a indução de arritmias em átrio direito isolado de ratos adultos. No presente estudo, a comparação do efeito da Enoxaparina® na indução de arritmias atriais em átrios de animais adultos e infantes sugere que o mecanismo arritmogênico estudado da Enoxaparina® em adultos é essencialmente o mesmo do de infantes. Verificamos que o efeito antiarrítmico máximo da Enoxaparina® para átrios infantes ocorre na concentração de 30 μM daquele fármaco, enquanto que, em átrio de animais adultos, o efeito antiarrítmico máximo ocorre para uma concentração 100 μM de Enoxaparina®. Entretanto, nas concentrações 5 μM e 7 μM não observamos diferença na amplitude de estímulo necessário para indução de arritmia, em relação da condição controle em animais infantes, enquanto que nos átrios de animais adultos verificou-se que na concentração de 50 μM de

Enoxaparina[®], também não houve diferença na amplitude de estímulo em relação à condição controle em animais adultos. Desta forma, verifica-se que a concentração de Enoxaparina[®] que possui um efeito antiarrítmico máximo em átrio de ratos infante não produz efeito no átrio de rato adulto. Porém, se aplicada à concentração de 50µM em animais infantes, ultrapassa-se o efeito antiarrítmico máximo deste fármaco nestes animais, levando inclusive a uma parada do ritmo atrial.

Mesmo não tendo medido diretamente o efeito da Enoxaparina[®] sobre os transportadores de cálcio, incluindo o TNC, nossos resultados estão coerentes com outros trabalhos (ALVES, 2009; DUARTE, 2006; ANTMAN *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2005) que sugerem que a Enoxaparina[®], entre outros fragmentos de heparina, possuem efeito antiarrítmico provavelmente por agir no TNC.

Em estudos realizados por Alves (2009) foi mostrado que o efeito antiarrítmico da enoxaparina, em átrio direito isolado de ratos adultos, é abolido pelo bloqueio farmacológico do TNC produzido pelo KB-R 7943. Adicionalmente, conforme sugerido na discussão do trabalho de Shinjo *et al.*, (2002), os fragmentos de heparina pode ser uma nova classe de medicamentos capazes de acionar a atividade do TNC. Isto corrobora a idéia de que um provável mecanismo dos efeitos observados no presente trabalho poderia estar ocorrendo pela ação da Enoxaparina sobre o TNC, no sentido de ativá-lo, levando a uma aceleração na extrusão do Cálcio intracelular, ou seja, por atenuar/reverter uma condição arritmogênica importante, que é a sobrecarga de Cálcio intracelular.

Estudos feitos por ZAFALON *et al.*, (2001) e HUANG *et al.*, (2004) propõe que a expressão TNC é maior em animais mais jovens, o que pode explicar, pelo menos em parte, a necessidade de concentrações menores de Enoxaparina[®] para se obter efeitos cronotrópicos em animais infantes, em relação ao que se observa em animais adultos. Adicionalmente, estas assertivas corroboram, uma vez mais, que a arritmia induzida em animais adultos e infantes são, provavelmente, mediadas pelo mesmo mecanismo antiarrítmogênico, sendo este, por sua vez, mediado pela ação da Enoxaparina[®] sobre o TNC.

Finalmente, sabendo-se que: 1- as arritmias alteram a frequência das contrações cardíacas causadas por anormalidades na gênese e/ou na condução da atividade

elétrica do coração; 2- o Ca^{2+} (principalmente sua sobrecarga no meio intracelular) tem papel seminal nestes processos e; 3- este papel é afetado de maneira importante pela idade, depreende-se que estudos adicionais acerca do efeito da idade sobre a regulação do Ca^{2+} ainda são necessários para se elucidar qual seria o melhor tratamento das arritmias cardíacas em uma determinada fase do desenvolvimento do animal. Neste sentido, no que concerne ao efeito cronotrópico da Enoxaparina[®] em coração de rato, observamos que a dose menos efetiva no adulto é letal para o infante, o que torna altamente relevante a consideração da idade do animal ao se utilizar este tipo de fármaco.

Desta forma, em última análise, nossos estudos fornecem subsídios experimentais importantes que podem ajudar no uso clínico apropriado deste tipo de fármaco, em relação à idade, seja como antitrombótico ou, futuramente, como anti-arrítmico.

6 CONCLUSÃO

1 – A Enoxaparina[®] reduz o ritmo normal de ratos infantis e adultos, sendo que sua efetividade ocorre em concentrações menores em infantis.

2 – A Enoxaparina[®] tem efeito antiarrítmico em animais infantis e adultos, sendo que sua efetividade ocorre em concentrações menores em infantis.

3- A dose de Enoxaparina[®] (50 μ M) que não tem efeito cronotrópico no átrio de rato adulto é letal para o átrio de rato infante.

4 – Os efeitos cronotrópicos acima são compatíveis com a idéia de haver maior expressão do TNC em animais infantis, em relação aos adultos.

Em suma, nossos dados alertam que a idade é um fator muito importante para prescrição clínica deste tipo de medicação.

REFERÊNCIAS

ALVES, A.; MARQUES, I. R.; Fatores relacionados ao risco de doença arterial coronariana entre estudantes de enfermagem. **Rev. Bras. Enferm.** v.62, n.6, p. 883-888, 2009.

ALVES, B.J.; **Efeito Inibitório de Derivados da Heparina em Arritmias Induzidas Eletricamente no Átrio Direito de Rato.** Mogi das Cruzes, p 82, Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade de Mogi das Cruzes, 2009.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart disease and stroke statistics – 2004 update.** Disponível em: <<http://www.americanheart.org>> Acesso em 22 jan. 2010.

ANTMAN, E. M.; COHEN, M.; McCABE, C.; GOODMAN, S. G.; MURPHY, S. A.; BRAUNWALD, E. Enoxaparin is superior to unfractionated heparin for preventing clinical events at 1-year follow-up of TIMI 11B and essence. **European Heart Journal.** v. 23, n. 4, p. 308-314, 2002.

ANTZELEVITCH, C. Basic Mechanisms of Reentrant Arrhythmias. **Curr. Opin.Cardiol.** v 16, n.1, p.1-7, 2001.

APPLEGATE, R.J.; GRABARCZYK, M. A.; LITTLE, W. C.; CRAVEN, T.; WALKUP, M.; KAHL, F. R.; BRADEN, G. A.; RANKIN, K. M.; KUTCHER, M. A. Vascular Closure Devices in Patients Treated With Anticoagulation and receptor Inhibitors During Percutaneous Revascularization. **Journal of the American College of Cardiology.** v. 40, n. 1, p. 78-83, 2002.

BABSKY, E. **Human Physiology.** Moscou: Mir Publishers, 1989, P. 86-14.

BAKER J. C, Enhance dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia, **Circulation Research**, v. 86, p.396,2000.

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

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 4. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 341-400.

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.

BRETTE, F.; ORCHARD, C. Resurgence of Cardiac T-Tubule. **Research Physiology**. v. 22, p. 167-173, 2007.

BRINKHOUS, K. M.; SMITH, H.P.; WARNER, E.D.; SEEGER, W.H. The inhibition of blood clotting. An unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent conversion of prothrombin to thrombin. **Am J Physiol** v.7, p 125-683,1939.

CAIN, M. E. Electrophysiologic assessment of sinus node function. **Research Circulation**. v. 75, n. 3, p. 100-102, 1987.

CAMARGO, P.R.; MOFFA, P. J.; EBAID, M. Arritmias em crianças. **Rev. Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**.v.8, n.1, p.105-116,1998.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL 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 2010.

CAIXEIRO M.; PEREIRA.C.,CUNHA.M. **Potencial de Membrana; Potencial de Repous**.Lisboa Portugal,p 15,Dissertação de Mestrado em Medicina, Universidade de Medicina de Lisboa,2007.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**: para o estudante de medicina. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004 p.685.

DIETRICH, C.P.; SHINJO, S.K.; MORAES, F.A.; CASTRO, R.A.; NADER, H.B.; GOUVEA, T.C. 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.

DRAGO, F. Isolated Neonatal Atrial Flutter: Clinical Features, Prognosis and Therapy. **G. Ital. Cardiol**, v.28,n.4,p.365-368, 1998.

DUARTE, J.; CARICATI-NETO, A.; GODOY, C.M.G.; **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.

DUBIN, A. Arritiarrhythmic drug therapy in the neonate. **Progress in Pediatric Cardiology**.v.11, n.1, p.1058-9813, 2000.

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)**, v. 31, p. 51-58, 2008.

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. **Research Circulation**. v. 99, p. 552-557, 1999.

GODOY, C.M.G.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. Role of Acetylcholine in Electric Stimulation Induced Arrhythmia in Rat Isolated Atria. **J. Cardio. Pharmacol.** v. 34, p. 475-479, 1999.

GOLDBERGER, J. J. Treatment and prevention of sudden cardiac death: effect of recent clinical trials. **Arch Intern Med**. v. 159, p. 1281-1287, 1999.

GOLDSTEIN, S.; BROOKS, M. M.; LEDINGHAM, R.; KENNEDY, H. L.; EPSTEIN, A. E.; PAWITAN, Y.; BIGGER, T. Association between ease of suppression of ventricular arrhythmia and survival. **Research Circulation**. v.91, n.1, p.79-83, 1995.

GRAY, H. *Anatomia*. 29^o ed. São Paulo: Guanabara, 1988.

GOTO, M.; NAGASHIMA, M.; BABA, R.; NAGANO, Y.; YOKOTA, M.; NISHIBATA, K.; TSUJI, A. Analysis of heart rate variability demonstrates effects of development on vagal modulation of heart rate in healthy children. **The Journal of Pediatrics**, v. 130, p.725-729, 1997.

GUYTON, Arthur C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, pg. 99-113.

HENK, E. D. J. K.; PENELOPE A. B. **Calcium and Arrhythmogenesis**. v. 87, p. 457-506, 2007.

HIRSH, J.; RASCHKE, R. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin .The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. **CHEST**, v.126, n.3, p.1885- 2035, 2004.

HUANG, J.; MADSEN, L. H.; TIBBITS, G.F. Na^+ / Ca^{2+} Exchange activity in neonatal rabbit ventricular myocytes. **Am Physiol Cell Physiol**. v. 288, p. 195-203, 2005.

JUNQUEIRA. J. F. L.; Considerações básicas sobre a organização estrutural e a fisiologia do aparelho cardiovascular. **Laboratório Cardiovascular – Clínica Médica**, p.3, 2005.

KIM, M.H.; TROHMAN, R.G.; EAGLE, K.A. Low molecular weight heparin in atrial fibrillation management: facts, fiction, and future. **Card Electrophysiol Rev**.v.7, n.4, p. 397-400, 2003.

LAMAS, G.A.; LEE, K. L.; SWEENEY, M. O.; SILVERMAN, R.; LEON, A.; YEE, R.; MARINCHAK, R. A.; FLAKER, G.; SCHRON, E.; ORAV, E.J.; HELLKAMP, A. S.; GREER, S.; McALNULTY, J.; ELLENBOGEN, K.; EHLERT, F.; FREEDMAN, R. A.; MERK ESTES, N. A.; GREENSPON, A.; GOLDMAN, L. Ventricular pacing or dual-chamber pacing for sinus node dysfunction. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 24, p. 1854-1862, 2002.

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

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

MASSIN, M.M.; MAEYNS, K.; WITHOFS, N.; RAVET, F.; GÉRARD, P. Circadian rhythm of heart rate and heart rate variability. **Archives of Disease in Childhood**, v. 83, n.2, p.179-182, 2000.

MEERSMAN, R.E.; STEIN, P.K. Vagal modulation and aging. **Biological Psychology**. n. 74, p.165-173, 2006.

NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Natural occurrence and possible biological role of heparin, In: heparin: **Chemical and Biological properties, clinical applications.** London, Edward Arnold Publisher, London. p.1981, 1989.

NARVÁEZ, N.T.; NÚÑEZ, M.L.V.A. Fibrilação Ventricular. **Voz Andez.** v.13,n.1, p. 31-35, 2000.

NASCIMENTO, T. A.; PAOLA, V. V. A; FENELON,G. Mecanismo das arritmias cardíacas:Fundamentos para o cardiologista clínico. **Rev. Soc. Cardiol.** Estado de São Paulo. v.3 , p.11- 22, 2008.

OPIE, L. H. The Heart Physiology, from Cell to Circulation. Philadelphia Lippincott-Raven , 1998, p. 637.

PRADO, M.J.S. Controle Autonômico a Frequência Cardíaca em Adolescentes em Treinamento. Campinas, p 107, Dissertação de Mestrado em Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

PRIORI, S.G., BARHAININ, J., HAUER, R.N., HAVERKAMP, W.; JONGSMA, H. J.; KLEBER, A.G.; McKENNA, W. J.; RODEN. D. M.; RUDY, Y.; SCHWATRZ, K. SCHWARTZ, P. J.; TOWBIN, J. A.; WILDE, A. M. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management parts I and II. Study group on molecular basis of arrhythmias of the Working Group on arrhythmias of the European Society of Cardiology. **Eur. Heart J.** v. 20, p. 174-195, 1999.

RIERA A.R.P. Eletro-Fármaco-Fisipatologia Dos Canais Iônicos Cardiacos e Sua Repercussão No Eletrocardiograma. **Simpósio de Arritmia e Eletrofisiologia.** São Paulo. v.6, p.1-26, 2007.

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. Heparin and heparan sulfate disaccharides bind to the exchanger inhibitor peptide region of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and reduce the cytosolic calcium of smooth muscle cell lines. **J. Biol. Chem.** v.50, n.277, p. 48227-48233, 2002.

STAUSS, H. M.; Modulation of baroreflex sensitivity and spectral power of blood pressure by heart stress and aging. **Am. J. Physiol** , n.271, p. H776-H784, 1997.

VASCONCELOS, J. T. M.; FILHO, S.S.G.; BARCELLOS, M. B. Interação entre drogas antiarrítmicas e limiares de desfibrilação em pacientes portadores de cardioversor desfibrilador implantável. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 80, n. 3, 2003.

VOLDERS, P. G. A.; VOS, M. A.; SZABO, B.; SIPIDO, K. R.; GROOT, S. H. M.; GORGELS, A. P. M.; WELLENS, H. J. J.; LAZZARA, R. Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. **Research Cardiovasc.** v. 46, p. 376-392, 2000.

WALDO, A. L.; WIT, A. Mechanisms of cardiac arrhythmias. **Lancet**. v. 341, p.1189-1193, 1993.

WANG, J.N. Ectopic atrial tachycardia in children. **Jornal of the Formosan medical association**. v. 99, n.10, p.766-770, 2000.

WATANABE, Y.; KOIDE, Y.; KIMURA, J. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger: Pharmacological Characterization of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Inhibitors. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 102, n. 1 pp.7-16, 2006.

WELLENS, H. J. Electrophysiology: ventricular tachycardia: diagnosis of broad QRS complex tachycardia. **Research Heart and Education in Heart**. v. 86, n. 5, p. 579-585, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics. Genevei 2005.** Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/> Acesso em 4 de fev. 2010.

WREN, C.; O'SULLIVAN, J. J.; WRIGHT, O. Sudden Death in Children and Adolescents. **Heart.** v. 83, n. 4, p. 410-413, 2000.

YOUNG, E., WELLS, P.; HOLLOWAY, S.; WEITS, J.; HIRSH, J. 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, 2001.

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](#)