

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENEFONTE

**EFEITOS DA ENOXAPARINA E DA HEPARINA NÃO FRACIONADA
EM DOSES PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA SOBRE AS TAXAS DE
FERTILIDADE DE RATAS WISTAR**

CAMPO GRANDE
2012

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENEFONTE

**EFEITOS DA ENOXAPARINA E DA HEPARINA NÃO FRACIONADA
EM DOSES PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA SOBRE AS TAXAS DE
FERTILIDADE DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Antonio Figueiró-Filho

CAMPO GRANDE
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENE FONTE

**EFEITOS DA ENOXAPARINA E DA HEPARINA NÃO FRACIONADA EM DOSES
PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA SOBRE AS TAXAS DE FERTILIDADE DE
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 31 de Agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernesto Antonio Figueiró-Filho

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras Tognini

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Prof. Dr. André Luís Alonso Domingos

Instituição: Universidade Anhaguera-Uniderp

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José Rubens Senefonte** e **Vera Márcia de Almeida Senefonte**. Pessoas que, com garra e determinação, conseguiram construir um alicerce bastante sólido sobre o qual eu e minhas irmãs sempre encontramos amor, afeto e apoio. Obrigado pela luta constante e persistência, sempre presentes para nos manter firmes em nossa caminhada e certos de nossas realizações.

Às minhas irmãs, **Luciele Senefonte** e **Thais Senefonte**, pessoas importantes na minha vida, das quais aprendi o verdadeiro significado do amor fraterno.

À minha esposa, amiga e companheira **Iris Augusta Duarte Fioravante Oliveira Senefonte**, presença constante e apoio em todos os momentos importantes e decisivos de minha vida, com quem aprendi a dar valor a pequenos gestos que, realizados com afeto, tornam-se obras grandiosas.

À minha filha, gerada e nascida durante o meu curso de mestrado, **Ana Flavia Senefonte**, que me proporcionou a alegria inestimável de ser pai. Cada sorriso e delicado gesto de bebê são verdadeiras injeções de ânimo e dão força revigorante para encarar os desafios da vida. Papai te ama muito.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, nosso supremo criador, amoroso mantenedor e misericordioso salvador, que nos proporciona tão boas condições de trabalho, raciocínio e equilíbrio para realização de todos os nossos projetos de vida.

Ao **Prof. Dr. Ernesto Antonio Figueiró-Filho**, mestre por excelência, modelo de ser humano e de cientista, pela orientação, ensinamentos, amizade, incentivo e seriedade, presentes desde antes do início desta pesquisa, precisamente, desde o estágio em obstetrícia durante minha faculdade, passando pela orientação na iniciação científica e no trabalho de conclusão do curso de medicina e meu grande incentivador a publicar artigos.

Aos meus **companheiros de turma**, por esses anos de convívio e amizade, tornando a jornada uma fantástica e inesquecível fase de minha vida.

Aos acadêmicos de medicina, **Marco Antônio Costa Bósio, Joelly Taynara Lapinski Levermann e Bruno Areco de Souza**, pela ajuda inestimável na fase experimental, em que sacrificaram horas de estudo e convívio familiar para me auxiliar na lida com os pequenos animais, desde a manutenção destes no biotério até nos momentos cruciais da pesquisa, até o fim.

Aos funcionários do Biotério, **todos**, que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste**, por meio de seus professores e funcionários, que possibilitaram a realização de um grande sonho, a concretização de um grande projeto.

Aos pequenos e inocentes **animais**, cujo sacrifício proporciona passos importantes ao desenvolvimento científico.

RESUMO

SENEFONTE, F.R.A. Efeitos da enoxaparina e da heparina não fracionada em doses profilática e terapêutica sobre as taxas de fertilidade de ratas *Wistar*. Campo Grande; 2012. [Dissertação - Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivou-se avaliar os efeitos da exposição da enoxaparina e da heparina não fracionada (HNF), em doses profilática e terapêutica sobre as taxas de fertilidade de ratas *Wistar* prenhes, pesando entre 160 e 250g. As drogas empregadas no experimento foram a enoxaparina e a HNF, nas doses profiláticas respectivamente de 1mg/Kg/dia e 72UI/Kg/dia administradas via subcutânea (SC) e nas doses terapêuticas, também respectivamente, de 2mg/Kg/dia e 400UI/Kg/dia. As ratas foram distribuídas em cinco grupos (I a V), nos quais foram randomizadas em grupos controle (I), enoxaparina dose profilática (II), enoxaparina dose terapêutica (III), HNF dose profilática (IV) e HNF dose terapêutica (V). Considerou-se o dia zero da prenhez de todos os animais como o início da experimentação. Realizou-se eutanásia por meio de uma dose letal anestésica, realizada no 21º dia de prenhez, após laparotomia para histerectomia e ooforectomia bilateral em bloco. Uma vez aberto o útero, contaram-se os fetos vivos e mortos, seguido da retirada destes fetos para anotação do sexo, pesagem dos fetos vivos e respectivas placentas. Dissecaram-se os cornos uterinos e, por observação direta, anotada a presença de reabsorções precoces e tardias (abortamentos). Obteve-se o número de sítios de implantação pela soma de fetos vivos, fetos mortos e reabsorções. Em seguida, removeram-se os ovários para contagem dos corpos lúteos. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística através dos testes “t” de Student e ANOVA para variáveis paramétricas e dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis para variáveis não-paramétricas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05. Conclusões: não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando se relacionou peso médio dos fetos, peso médio das placentas, taxa de feminilidade e masculinidade, taxa de perdas pré-implantação, taxa de eficiência de implantação, taxa de perdas pós-implantação e taxa de viabilidade fetal, entretanto, houve maior frequência de eventos hemorrágicos nos grupos anticoagulados em dose terapêutica (grupos III e V), com diferença significativa.

Palavras chave: Anticoagulantes, Heparina, Enoxaparina, Taxas de fertilidade.

ABSTRACT

SENEFONTE, F.R.A. Effects of enoxaparin and unfractionated heparin in prophylactic and therapeutic doses on the fertility rates of *Wistar* rats. Campo Grande, 2012. [Dissertation, Faculdade de Medicina "Dr. Helio Mandetta " Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil].

This study aimed to assess the effects of exposure of enoxaparin and unfractionated heparin (UFH) in prophylactic and therapeutic doses on fertility rates of pregnant *Wistar* rats weighing between 160 and 250g. The drugs used in the experiment were enoxaparin and UFH in prophylactic doses respectively 1mg/Kg/day 72UI/Kg/dia and administered subcutaneously (SC) and in therapeutic doses, also respectively 2mg/kg/day and 400 IU / kg / day. The rats were divided into five groups (I to V), in which they were randomized into control group (I), prophylactic dose enoxaparin (II), therapeutic dose enoxaparin (III), prophylactic dose UFH (IV) and therapeutic dose UFH (V). It was considered day zero of gestation from all animals as early experimentation. Euthanasia was performed by means of an overdose of anesthesia, performed on day 21 of pregnancy after laparotomy for hysterectomy and bilateral oophorectomy block. Once opened the womb, fetuses were counted living and dead, followed by the withdrawal of these fetuses annotation for sex, weighing of live fetuses and their placentas. The uterine horns were dissected and, by direct observation, noted the presence of early and late resorptions (abortions). The number of implantation sites obtained as the sum of fetuses alive, dead fetuses and resorptions. Then, the ovaries were removed for counting corpora lutea. Data were statistically analyzed using the tests "t" test and ANOVA for parametric variables and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test for nonparametric variables. When the value of "p" was less than 0.05 were considered statistically significant. Conclusions: No statistically significant differences were found between groups when related average weight of fetuses, placentas of average weight, rate of femininity and masculinity, loss rate pre-deployment, deployment efficiency rate, the rate of post-implantation loss and rate of fetal viability, however, there was a higher frequency of bleeding events in anticoagulated at therapeutic dose groups (groups III and V), with a significant difference.

Keywords: Anticoagulants, Heparin, Enoxaparin, Fertility rates

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias do ganho de peso diário após 7 dias de prenhez.....	43
Tabela 2- Médias do ganho de peso diário após 14 dias de prenhez.....	44
Tabela 3- Médias do ganho de peso diário após 21 dias de prenhez.....	44
Tabela 4- Médias do ganho de peso diário nos diferentes períodos de prenhez.....	45
Tabela 5- Taxas de perda pré-implantação (TPP) após 21 dias de prenhez.....	45
Tabela 6- Taxas de eficiência de implantação (TEI) após 21 dias de prenhez.....	46
Tabela 7- Taxas de perda pós-implantação (TPPI) após 21 dias de prenhez.....	46
Tabela 8- Taxas de viabilidade fetal (TVF) após 21 dias de prenhez.....	47
Tabela 9- Taxas de masculinidade (TM) após 21 dias de prenhez.....	47
Tabela 10- Taxas de feminilidade (TF) após 21 dias de prenhez.....	48
Tabela 11- Médias do número de fetos/animal após 21 dias de prenhez.....	48
Tabela 12- Médias do peso dos fetos após 21 dias de prenhez.....	49
Tabela 13- Médias do peso das placentas após 21 dias de prenhez.....	49
Tabela 14- Frequência de animais que apresentaram eventos hemorrágicos durante os 21 dias de prenhez.....	50
Tabela 15- Médias de contagem plaquetária dos animais durante 21 dias de prenhez.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação dos anticoagulantes segundo o FDA.....	24
Figura 2- Distribuição dos animais em grupos e drogas utilizadas.....	36
Figura 3- Rata após anestesia, posicionada antes do procedimento cirúrgico.....	39
Figura 4- Cornos uterinos com a presença dos fetos e placentas com 21 dias de preñez.....	39
Figura 5- Cornos uterinos retirados “em bloco” com a presença de fetos e respectivas placentas com 21 dias de preñez.....	40
Figura 6- Cornos uterinos íntegros com fetos em preñez de 21 dias evidenciando a diferença de tamanho dos fetos. Corpos lúteos individualizados.....	40
Figura 7- Cornos uterinos abertos evidenciando os fetos, placentas, sítios de implantação e corpos lúteos após 21 dias de preñez.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância.
AT	Anti-trombina.
AZT	Azidotimidina.
BAX	BCL-2 Associated to protein X.
BCL-2	B-Cell Lymphoma protein.
CASPASE	<u>cysteine-aspartic-acid-proteases</u>
DP	Desvio padrão.
FDA	Food and Drug Administration.
IP	Intraperitoneal.
IM	Intramuscular.
IV	Intravenoso.
HELLP	HE - Anemia hemolítica, do inglês: Hemolytic anemia; EL - Enzimas hepáticas elevadas, do inglês: Elevated Liver enzymes; LP - Baixa contagem de plaquetas, do inglês: Low Platelet count.
HBPM	Heparina de Baixo Peso Molecular.
HNF	Heparina não fracionada.
NFV	Nelfinavir.
n.s	Não significativo.
PCa	Proteína C ativada.
PE	Pré-eclâmpsia.
PS	Proteína S.
RNI	Razão normatizada internacional.
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípide.
SC	Subcutâneo.
SF	Solução fisiológica. Soro fisiológico.
TEI	Taxa de eficiência de implantação.
TEV	Tromboembolismo venoso.
TEP	Tromboembolia pulmonar.
TVF	Taxa de viabilidade fetal.
TVP	Trombose venosa profunda.

TPP	Taxa de perda pré-implantação.
TPPI	Taxa de perda pós-implantação
3TC	Lamivudina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

LISTA DE SIMBOLOS

d	Dia.
dl	Decilitro.
g	Gramma.
h	Hora.
Kg	Quilograma.
<	Menor que.
mg	Miligrana.
ml	Mililitro.
mm ³	Milímetro cúbico.
%	por cento.
UI	Unidades internacionais.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Anticoagulação no período gestacional.....	21
2.2 Efeitos das heparinas sobre modulação trofoblástica e seus efeitos anti-apoptóticos.....	25
2.3 Estudos experimentais sobre efeitos das heparinas sobre metabolismo ósseo, processos inflamatórios e cicatrizacionais em ratos.....	27
2.4 Estudos experimentais sobre taxas de fertilidade das ratas Wistar expostas a determinados fármacos e ou situações de estresse.....	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 HIPÓTESES	33
5 MATERIAL, ANIMAIS E MÉTODOS	34
6 RESULTADOS	43
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	65
ANEXO A- Carta de aprovação do comitê de ética.....	65
ANEXO B- Tabela de ajuste de dose do grupo V.....	66

1 INTRODUÇÃO

A importância do tema é justificada por ser a doença tromboembólica a principal causa de mortalidade materna nos países desenvolvidos e o seu tratamento, à base de anticoagulantes, ainda com algumas controvérsias (BATES, 2012).

A principal droga anticoagulante é a varfarina, que por atravessar a barreira placentária e ter efeito positivo sobre teratogênese fetal, encontra-se contra-indicada na gestação, salvo algumas poucas indicações (BATES, 2012). Alternativamente, neste período, pode-se e é mais utilizada a heparina não fracionada (HNF), que não atravessa a barreira placentária (SARDINHA; SILVESTRE, 2006). Entretanto, esta droga exige monitoração constante da anticoagulação com ajustes de dose e sabidamente pode provocar osteopenia materna com seu emprego por períodos prolongados, como na gravidez (VASCONCELOS, 2006). Em uso cada vez mais frequente devido, em comparação com a HNF, apresentar menor risco de sangramento e osteopenia, não ter necessidade de monitorização do efeito anticoagulante e conseqüentemente, sem necessidade de ajustes de dose, a enoxaparina tem seu emprego crescente na prática médica (SARDINHA; SILVESTRE, 2006) e em especial no período gestacional, contudo, sem estudos clínicos e experimentais amplos com demonstração de sua segurança. Um modelo experimental para avaliar efeitos de drogas em animais prenhes sobre taxas de fertilidade e prognóstico perinatal de suas crias pode responder alguns questionamentos.

A morte fetal *in utero*, a restrição de crescimento fetal intrauterino, a pré-eclâmpsia grave e de início precoce são causas importantes de morbimortalidade perinatal (BATES, 2012). No exame histológico dos vasos uteroplacentários e da arquitetura da invasão trofoblástica dessas gestações são típicos o aumento da deposição de fibrina, a trombose e as

alterações endoteliais e do trofoblasto associados à hipóxia. Estes achados sugerem que a trombose da circulação uteroplacentária está implicada na fisiopatologia destes quadros obstétricos (SILVEIRA, 2002).

A trombose venosa ocorre quando os equilibrados sistemas de coagulação e fibrinólise perdem a sua auto-regulação. O mecanismo de coagulação pode ser alvo de alterações fisiológicas as quais ocorrem na gravidez normal (UCHIKOVA; LEDJEV, 2005; O'RIORDAN; HIGGINS, 2003; HELLGREN, 2003; SILVEIRA, 2002; KENKES-MATTHES, 2001;), ou após mecanismo desencadeante como restrição ao leito, trauma, entre outros, associados ou não a características genéticas predeterminadas, como as trombofilias, e assim, manifestar um quadro de trombose venosa (THOMAS; VILLAS, 2006).

Entre os fatores de risco para trombose, temos o trauma, a malignidade, antecedente de trombose venosa, sepse, insuficiência cardíaca, varizes dos membros inferiores, tabagismo, obesidade, uso de hormônios femininos, estados gestacionais/ puerperais, algumas entidades clínicas como vasculites (entre elas a Doença de Behçet), policitemias e retocolites e principalmente, predisposição genética à trombose venosa, as trombofilias (THOMAS; VILLAS, 2006).

Em relação às trombofilias são conhecidas principalmente as deficiências de antitrombina, de proteína C, de proteína S, aumento da concentração do fator VIII, a mutação do gene da protrombina e do fator V de Leiden (THOMAS; VILLAS, 2006).

Atualmente, a presença de trombofilias tem sido relacionada com a maioria dos eventos trombóticos venosos maternos e com complicações adversas da gravidez (OLIVEIRA, 2010; FIGUEIRÓ-FILHO, 2012; FIGUEIRÓ-FILHO; OLIVEIRA, 2007; KUJOVICH, 2004; MONGA; DOYLE, 2004).

Trombofilia é definida como um conjunto de alterações específicas, adquiridas ou hereditárias que condicionam um estado de hipercoagulabilidade e um aumento do risco de

evento tromboembólico (MONGA; DOYLE, 2004), ou seja, uma predisposição para a trombose, mas que apenas a simples presença de um ou mais genes afetados, seria insuficiente para causar um evento trombótico clínico. Pode-se afirmar que o portador de trombofilia está em constante risco de tromboembolismo, entretanto, é necessário um estímulo trombogênico para iniciar a cascata da trombose. Ressalta-se também que, na vigência de uma trombose desproporcional a certo estímulo, deve-se investigar a ocorrência de uma trombofilia (FIGUEIRÓ-FILHO, 2012; OLIVEIRA, 2010; FIGUEIRÓ-FILHO; OLIVEIRA, 2007).

História obstétrica de perdas fetais no 2.º e 3.º trimestres, descolamento prematuro de placenta, restrição de crescimento intrauterino grave e pré-eclâmpsia grave e de início precoce, bem como antecedente de tromboembolismo venoso em mulheres justifica atualmente à busca ativa por trombofilias, principalmente as hereditárias, que são as maiores responsáveis por estes acontecimentos (FIGUEIRÓ-FILHO, 2012; OLIVEIRA, 2010; FIGUEIRÓ-FILHO; OLIVEIRA, 2007; KUJOVICH, 2004; MONGA; DOYLE, 2004; LOCKWOOD, 2002).

O período gestacional é conhecido como de risco no surgimento de eventos tromboembólicos, em função das modificações fisiológicas e anatômicas (UCHIKOVA; LEDJEV, 2005; HELLGREN, 2003; O'RIORDAN; HIGGINS, 2003; SILVEIRA, 2002; KENKES-MATTHES, 2001; GINSBERG, 1999). As adaptações fisiológicas no período gestacional visam à redução dos riscos de hemorragia no momento do parto, contudo, cria-se um estado de hipercoagulabilidade (FIGUEIRÓ-FILHO, 2012; OLIVEIRA, 2010). Há aumento dos níveis de todos os fatores da coagulação, exceto fatores XI e XIII, com aumento dos níveis de fibrinogênio, quando comparados a não gestantes (UCHIKOVA; LEDJEV, 2005). Uma das explicações para este aumento seria o maior volume plasmático durante o terceiro trimestre (HELLGREN, 2003; KEMKES-MATTHES, 2001). Também no terceiro trimestre ocorrem mudanças hormonais, como aumento dos níveis de estrogênio, com

modulação das variáveis dos fatores de coagulação. Ocorrência similar é observada em mulheres que usam anticoncepcionais orais (UCHIKOVA; LEDJEV, 2005).

O volume plasmático maior no último trimestre promove uma pequena trombocitopenia dilucional além do discreto aumento de consumo plaquetário. Hayashi *et al.* (2002) constataram que durante a gestação a produção de tromboxano A₂, que induz a agregação plaquetária, apresenta aumento progressivo.

Em mulheres portadoras de trombofilias, este período se torna perigoso por predispor a trombose em diversos sítios vasculares, com elevada morbimortalidade (SILVEIRA, 2002; GINSBERG, 1999;).

O tratamento é realizado com anticoagulantes (SARDINHA; SILVESTRE, 2006). Estes medicamentos podem ser de vários tipos e os principais usados no tratamento do tromboembolismo são os anticoagulantes orais derivados dos cumarínicos, sendo a varfarina a mais conhecida, e as heparinas, que são anticoagulantes de uso predominantemente parenteral.

Estas drogas variam de acordo com seu mecanismo de ação, complicações, antídotos, formas de administração, passagem através da barreira placentária (neste caso, os cumarínicos), métodos laboratoriais de controle e ajuste de dose e contraindicações. Suas principais complicações são sangramento, necrose de pele, alopecia, osteopenia e trombocitopenia (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; SHEFRAS; FARQUAARSON, 1996; WARKENTIN, 1995; HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b), estas duas últimas associadas às heparinas, quando em uso prolongado.

Por sua vez, no melhoramento químico das heparinas a fim de diminuir suas restrições e complicações surgiram às conhecidas heparinas de baixo peso molecular (HBPM), com destaque para a enoxaparina, medicação desta classe mais utilizada no mundo (SARDINHA; SILVESTRE, 2006).

A trombose venosa incide na população geral em torno de 16:1.000 habitantes, conforme estudo realizado em Malmoe em 1992. É rara em jovens, exceto em pessoas com predisposição genética, os trombofílicos (THOMAS; VILLAS, 2006).

Em mulheres grávidas, as modificações fisiológicas e metabólicas associadas ou não a tabagismo e trombofilia as deixam mais vulneráveis ao desenvolvimento da trombose (UCHIKOVA; LEDJEV, 2005; HELLGREN, 2003; O'RIORDAN; HIGGINS, 2003; SILVEIRA, 2002; KENKES-MATTHES, 2001). Tanto que o tromboembolismo venoso é considerado a principal causa de doença e mortalidade materna durante a gestação e puerpério em países desenvolvidos (ROBIN, 1999). O risco parece também aumentar conforme se aumenta a faixa etária materna ou quando há histórico prévio da doença (SILVEIRA, 2002).

Como a principal droga usada no tratamento da trombose, o anticoagulante oral cumarínico varfarina, atravessa a barreira placentária com risco teratogênico e hemorrágico materno e fetal, o seu uso é limitado durante a gravidez (BATES, 2012; SILVEIRA, 2002; HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b). Também é indicado em portadores de válvulas cardíaca artificiais e de fibrilação atrial, sendo no segundo trimestre gestacional controversamente liberado, com muita discussão, quando a gestante é portadora de válvula cardíaca artificial metálica (BATES, 2012).

Os protocolos de tratamento anticoagulante neste período sugerem que o uso da varfarina seja interrompido logo dado a confirmação da gestação, sendo contraindicado entre a 6ª e 12ª semanas, podendo ser reutilizadas entre 13ª semana até meados do terceiro trimestre da gestação (34ª semana). Nestes períodos sem o cumarínico, utilizam-se as heparinas (BATES, 2012; SILVEIRA, 2002; GINSBERG, 1999; ROBIN, 1999).

As heparinas se subdividem em não fracionadas (HNF), de alto peso molecular e as fracionadas ou HBPM (SARDINHA; SILVESTRE, 2006).

As vantagens do uso das HBPM em relação às HNF residem na forma de aplicação (1 a 2x/dia, por via subcutânea) e a não necessidade de controle laboratorial para ajuste de dose (SARDINHA; SILVESTRE, 2006). Entretanto, seu uso se limita a poucos estudos sobre seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário-fetal. Apesar de classificadas como HBPM, as variadas drogas desta classe como a enoxaparina, a dalteparina, a fraxiparina, a nadroparina, a tinzaparina, a ardeparina e a reviparina não demonstram total bioequivalência, tanto que foram classificadas pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) como drogas distintas, apesar da tendência nos artigos e livros de agrupá-las pela característica química em HBPM. Foi encontrada bioequivalência entre a enoxaparina e a dalteparina para a atividade anti-Xa (SARDINHA; SILVESTRE, 2006).

Os bulários das HBPM advertem quanto ao seu uso no período gestacional, mas na literatura são disponíveis muitos relatos que concluíram sua segurança, eficácia e facilidade de uso durante a gravidez (BATES, 2012).

Deste modo, o uso das heparinas no ciclo grávido-puerperal merece as seguintes considerações:

- Risco de sangramento na junção útero-placentária, abortamento, descolamento de placenta, prematuridade e óbito fetal.
- As heparinas não são secretadas no leite materno e tem seu uso permitido no puerpério (BATES, 2012; DIMITRAKAKIS, 2000; HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b).
- As heparinas não atravessam a barreira placentária (VASCONCELOS, 2006; DIMITRAKAKIS, 2000; HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b)
- As HBPM parecem estar associadas a menor risco de sangramento, de osteoporose e de trombocitopenia induzida por heparina do que as HNF (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; SANSON, 1999).

- Raros casos de necrose de pele podem acontecer (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; THOMAS; VILLAS, 2006).

Por fim, devido lacunas no conhecimento sobre os efeitos dos anticoagulantes enoxaparina e heparina não fracionada, em modelos experimentais de gestação, entre eles, sobre as taxas de fertilidade e prognóstico perinatal de suas crias, objetivou-se com este estudo avaliar se a exposição de ratas *Wistar* prenhes a estes fármacos descritos influencia ou não negativamente em suas taxas de fertilidade e em seus produtos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anticoagulação no período gestacional

A anticoagulação no período gestacional levanta problemas peculiares, quer pela maior incidência de eventos tromboembólicos nesse período como pelas potenciais reações adversas de seu emprego tanto para mãe quanto para o feto. Além dos anticoagulantes clássicos, existe ainda o uso combinado com o ácido acetil salicílico, quando a gestante esta afetada pela síndrome de anticorpos antifosfolípide (SAAF) ou em outras trombofilias (DIMITRAKAKIS, 2000; GINSBERG, 1999). Estudos de placentas humanas demonstraram alterações trombóticas quando havia associação com trombofilias e perdas fetais, o que sugeriu que os fármacos anticoagulantes possam ter benefícios terapêuticos nas mulheres com complicações vasculares gestacionais.

A heparina não fracionada (HNF) é considerada o medicamento de referência para seu emprego na gravidez (BATES, 2012; GINSBERG, 1999; ROBIN, 1999). O uso de anticoagulantes orais, como o derivado cumarínico varfarina, apresenta problemas específicos como embriopatia, cujo risco esta aumentado entre a sexta e decima segunda semanas de gestação, além de um risco adicional maior de sangramento fetal e intracraniano (HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b).

Com objetivo de substituir de vez o emprego da HNF no período gestacional, cada vez mais esta sendo usada a heparina de baixo peso molecular (HBPM), como a enoxaparina. Ela também não atravessa a barreira placentária, por ser composta por moléculas grandes, não causando hemorragia fetal ou teratogenicidade (DIMITRAKAKIS, 2000), além de possuir melhor biodisponibilidade, (ROBIN, 1999). Discute-se também que pode ser menos provável

que induza a plaquetopenia e a osteoporose (SHEFRAS; FAQUHARSON, 1996; WARKENTIN, 1995). Vantagens adicionais se relacionam pela maior praticidade de uso e a dispensa de monitorização frequente dos níveis de anticoagulação (SARDINHA; SILVESTRE, 2006).

Os principais efeitos colaterais em relação ao uso de anticoagulantes no período gestacional e ou complicações inerentes ao uso de heparinas são: trombocitopenia, reações cutâneas, sangramentos e osteoporose (THOMAS; VILLAS, 2006; PIERCY, 1997). A incidência de osteoporose estima-se afetar cerca de 2% de quem faz uso prolongado de heparinas e seu aparecimento parece ser maior quando já há quadro de osteopenia prévia e deficiência de vitamina D (PIERCY, 1997). A explicação para ocorrer este evento baseia-se na maior atividade de osteoclastos e aumento de fosfatase ácida, estimulada por paratormônio, que se observou em um modelo experimental com ratos expostos às heparinas (PIERCY, 1997).

Piercy *et al.* (1997) realizaram estudo prospectivo tipo coorte com 61 gestantes de alto risco para TEV. Estas gestantes tiveram 69 gestações acompanhadas pelo estudo, que avaliou as densidades ósseas da coluna lombar e de um arco costal das mesmas, que foram expostas a dose profilática de enoxaparina subcutânea de 40mg uma vez ao dia durante 16 meses, da gestação ao pós-parto. Nesta amostra de coorte não foi observada plaquetopenia e prematuridade, mas, uma gestante teve TEP no pós-parto. Apenas 28 das 61 mulheres mantiveram seguimento adequado e destas, 9 (32%) apresentaram algum grau de osteopenia na densitometria realizada 16 meses após o último parto, que foi considerado alto (PIERCY, 1997).

O uso de HBPM nas grávidas com trombofilias deve ser iniciadas logo após confirmação ecográfica da viabilidade embrionária ou fetal. Embora saiba-se que as HBPM não necessitem de monitorização constante, na gravidez ocorrem alterações fisiológicas

(cardiovasculares, hemostáticas e renais) além de uma produção da heparinase placentária que altera a farmacocinética das HBPM, motivo pelo qual alguns autores sugerem considerar o seu monitoramento através da dosagem da atividade do fator Xa (BRENNER, 2005).

Sua segurança parece ter sido comprovada durante o segundo e terceiro trimestre de gestação (SANSON, 1999), porém poucos estudos têm avaliado sua segurança no primeiro trimestre.

O estudo conduzido por Brenner *et al.* (2000) mostrou que o tratamento com HBPM iniciada no primeiro trimestre de gestação em pacientes com histórico de abortamentos de repetição e morte fetal intrauterina portadoras de diagnóstico de trombofilias, resultou em aumento significativo do número de filhos vivos. O número de crianças nascidas vivas sem a utilização da HBPM esteve em torno de 20%, enquanto os nascidos vivos após o uso da HBPM ficou em torno de 75%. O mecanismo para explicar este efeito ainda é desconhecido, mas parece estar envolvido com o fenômeno de trombose placentária, modulação da invasão trofoblástica e apoptose dos tecidos placentários e deciduais (ZHANG, 2012; ERDEN, 2006).

A literatura não fornece informações suficientes entre o nível do risco de desordens tromboembólicas e a dose de heparina para sua prevenção. Deste modo a modificação da dose, de acordo com a situação clínica ou com o período gestacional continua a ser estudada.

As drogas utilizadas no período gestacional são classificadas quanto a sua segurança no seu emprego no período gestacional pela FDA, como pode ser observado na figura 1.

Classe	Droga	Outros nomes	Passagem placentária	Estudos carcinogênicos	Estudos teratogênicos	*FDA
Heparinas	Heparina não fracionada (HNF)	Heparina	Não	Não há evidências confirmadas até o momento.	Não há evidências confirmadas até o momento.	(C)
	Heparina de Baixo Peso Molecular (HBPM)	Enoxaparina	Não	Não há evidências confirmadas até o momento.	Não há evidências confirmadas até o momento.	(B)
Cumarínicos	Varfarina		Sim	Não há evidências confirmadas até o momento.	Positivo (efeito dose dependente sobre ossos e cartilagens- Condromalácia, hipoplasia de membros, microcefalia, hipoplasia nasal)	(D)

Figura 1- Classificação dos anticoagulantes segundo o FDA.

Classificação da **Food and Drug Administration* (FDA), que se baseia em graus de informações disponíveis em relação ao risco para o feto, equilibradas quanto aos potenciais benefícios para a paciente.

Categoria A: Estudos controlados não demonstram riscos;

Categoria B: Sem evidências de risco em humanos; Estudos em animais não demonstraram riscos ou estudos em animais demonstram riscos, porém estudos em humanos não demonstraram.

Categoria C: Risco não pode ser definido pela falta de estudos, porém, potencial benefício pode justificar seu uso, apesar do risco;

Categoria D: Evidência positiva de risco para o feto. Em algumas circunstâncias o benefício do uso pode justificar o risco.

Categoria X: Contra-indicado na gravidez. O risco fetal claramente contra-indica o uso.

NA: Não avaliado.

Devido às perguntas que surgem sobre o uso dos anticoagulantes durante a gestação, o emprego de estudos experimentais ajuda a esclarecer algumas questões e podem levantar muitas outras. Ao se buscar nas bases de dados as palavras-chave deste trabalho, com refinamento para uso de heparinas em ratos foi constatado dois picos de publicação, que ocorreram em 1997 e 2006.

2.2 Efeitos das heparinas sobre modulação trofoblástica e seus efeitos anti-apoptóticos.

O benefício do uso de heparinas em pacientes com perdas fetais recorrentes, abortamentos e pré-eclâmpsia já é conhecido, entretanto, seu mecanismo não está totalmente esclarecido (ERDEN, 2006). Neste sentido, na tentativa de explicar o processo protetor proporcionado pelas heparinas na gestação, vários trabalhos estão sendo publicados com enfoques na modulação trofoblástica, proteínas de adesão intercelular e processo de apoptose celular. O uso das HBPM também é aplicado nestes estudos devido seu uso crescente.

Neste sentido, sobre a modulação trofoblástica, Erden *et al.* (2006) estudaram os efeitos da heparina não fracionada (HNF), tinzaparina e enoxaparina sobre a expressão das proteínas E-caderina e laminina nos tecidos placentários em ratas *Wistar*.

A proteína E-caderina tem papel fundamental na invasão trofoblástica, pois se trata de uma proteína relacionada à adesão celular, enquanto que a laminina é uma das principais macromoléculas da matriz extra-celular, sendo responsável pela morfogênese, arquitetura e estabilidade da membrana basal e manutenção dos tecidos (ERDEN, 2006).

A modulação anormal da E-caderina parece estar relacionada a histórico de perdas fetais e abortos de repetição (ERDEN, 2006), enquanto que a HNF e as HBPM são conhecidas por diminuir a incidência de perdas fetais em pacientes com este histórico, embora o real mecanismo ainda não esteja completamente compreendido. No estudo realizado por Erden *et al.* (2006) avaliou-se a expressão da E-caderina e da laminina através de imunohistoquímica placentária e decidual de ratas expostas a solução fisiológica (SF), HNF, Enoxaparina e Tinzaparina, cujo resultado foi de que as drogas anticoagulantes utilizadas modularam melhor a expressão da proteína E-caderina, mas não interferiram na expressão de laminina. Este achado pode justificar a menor taxa de perdas fetais ou abortamentos, mas, não elucidou todo este mecanismo protetor (ERDEN, 2006).

Depois da modulação trofoblástica melhorada com o emprego da HNF e das HBPM e as primeiras demonstrações das modificações da expressão de proteínas de adesão intercelular (ERDEN, 2006), o novo alvo das pesquisas tem sido o efeito antiapoptótico destas drogas.

O efeito antiapoptótico da enoxaparina foi demonstrado em tecido cardíaco e hepático (DEEPA; VARALAKSHIMI, 2003) e renal (DEEPA; VARALAKSHIMI, 2006). Em linha de pesquisa semelhante, Yu (2008) publicou estudo sobre efeito antiapoptótico do glutamato.

Estes efeitos antiapoptóticos das heparinas estão relacionados à sua modulação sobre as proteínas relacionadas à apoptose expressas pelos Linfocitos T citotóxicos: BCL-2 (*B-Cell Lymphoma Protein*) com efeito anti-apoptotico e BAX (*BCL-2 associated to protein X*) com efeito pró-apoptótico. Estas proteínas são conhecidas como CASPASES (*cysteine-aspartic-acid-proteases*), sendo descritas como um grupo de proteases baseadas em cisteína, que são essenciais para apoptose celular (DANIEL; KORSMEYER, 2004).

Estudo realizado por Zhang *et al.* (2012) observou efeito antiapoptótico placentário com o uso das HBPM em modelo experimental de ratas com pré-eclâmpsia. Neste trabalho 30 ratas *Wistar* foram distribuídas aleatoriamente em três grupos. Um grupo recebeu apenas solução fisiológica em volume semelhante ao da enoxaparina, outro grupo teve indução de pré-eclâmpsia (PE) experimental com a introdução de L-name e foi utilizado também solução fisiológica (SF) e o terceiro grupo, recebeu L-name para induzir a PE e enoxaparina. Foi avaliada pressão arterial, proteinúria, número de filhotes, peso de fetos e placentas enquanto o índice de apoptose foi medido com ensaio TUNEL de Western-blotting para BCL-2 e BAX. O índice de apoptose foi significativamente maior no grupo PE com SF e houve uma supressão significativa da expressão de BAX no grupo tratado com enoxaparina.

Atualmente, parece ser o mecanismo antiapoptótico das heparinas que norteará as próximas pesquisas tanto experimentais quanto clínicas com seu emprego. Outra publicação revelou um efeito protetor das heparinas sobre o processo neuroinflamatório decorrente de

mecanismo apoptótico em tecidos cerebrais expostos a sangue, como nos casos de hemorragia subaracnóide (SINARD, 2012). Baseado em um modelo experimental de hemorragia subaracnoide em ratos expostos a dose subanticoagulante de heparina não fracionada (10U/Kg/h) encontraram-se resultados animadores em relação a um menor processo neuroinflamatório do que no grupo controle, exposto a solução fisiológica (SINARD, 2012).

Novos estudos nesta linha de pesquisa devem aparecer com mais frequência nos próximos anos.

2.3 Estudos experimentais sobre efeitos das heparinas sobre metabolismo ósseo, processos inflamatórios e cicatrizacionais em ratos.

Uma linha de pesquisa muito abordada sobre modelo experimental com ratos e uso de heparinas envolve o metabolismo ósseo e cicatrizacional.

Os efeitos osteopênicos das heparinas, tanto a HNF quanto a HBPM são bem conhecidos. Entretanto, pouco se sabe sobre sua reversibilidade e o tempo que pode levar para que ocorra. Neste sentido Shaughnessy *et al* (1999) pesquisaram por meio de uma avaliação histomorfométrica de fêmur de ratos se a perda óssea induzida pela heparina seria revertida depois da descontinuação do tratamento em ratos por um período semelhante ao tempo de uso. Neste estudo foram utilizados heparina não fracionada (HNF) em doses de 1UI/g Subcutâneo (SC) 12/12h ou HNF 0,5UI/g SC 12/12h ou solução fisiológica (SF) na mesma proporção de volume, também através da via SC 2x/dia, durante 28 dias. Metade dos animais de cada grupo após este período inicial teve análise histomorfométrica e a outra metade foi mantida por mais 28 dias sem administração das drogas/ SF para realizar a eutanásia para

análise da placa de crescimento epifisário proximal do fêmur direito dos animais. A perda óssea observada logo após o tratamento foi maior no grupo que recebeu HNF 1UI/g, com perda média de 30% de massa óssea. Não se observou melhora dos parâmetros de perda óssea nos grupos tratados com HNF após 28 dias da suspensão da medicação, o que sugeriu a baixa reversibilidade dos efeitos ou a necessidade de períodos maiores de observação.

Em virtude dos efeitos osteopênicos, uma preocupação tomou conta dos profissionais da ortopedia: o uso de heparinas em pacientes com fraturas ou em pós-operatório de cirurgias ortopédicas reconstrutivas, principalmente em doses profiláticas para tromboembolismo venoso, situação corriqueira nestes tipos de pacientes, que ficam períodos prolongados com imobilização e restrição ao leito. Curcelli *et al.* (2005) publicaram estudo experimental com ratos em modelo para avaliar os efeitos da heparina não fracionada (HNF) e da enoxaparina sobre a consolidação óssea. Utilizaram-se 72 ratos, separados em três grupos, sendo um controle (com administração de solução fisiológica), um com HNF (dose 200Ui/Kg SC 12/12h) e outro com enoxaparina (1mg/Kg SC 12/12h). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à consolidação óssea, provavelmente porque o período de uso não foi prolongado, como não é também na prática clínica.

2.4 Estudos experimentais sobre taxas de fertilidade das ratas Wistar expostas a determinados fármacos e ou situações de estresse.

No tocante à avaliação de taxas de fertilidade de ratas Wistar, poucos trabalhos experimentais encontram-se disponíveis (HOLLENBACH, 2008; CASTRO, 2005; FIGUEIRÓ-FILHO, 2002; ALMEIDA, 2000). Este modelo experimental se baseia em promover o cruzamento dos ratos e acompanhar a gestação desde o dia zero, diagnosticado

através da observação direta de espermatozoide no exame à fresco de esfregaço vaginal. Após o período de 21 dias de prenhez das ratas, realiza-se laparotomia com análise da quantidade de corpos lúteos, sítios de implantação, número de fetos vivos, taxas de masculinidade e feminilidade (WEINSTEIN; STARK, 1994). Com estes achados, calcula-se a taxa de viabilidade fetal, taxa de perda pré-implantação, taxa de perda pós-implantação e taxa de eficiência da implantação (FIGUEIRÓ-FILHO, 2002; ALMEIDA, 1999; WEINSTEIN; STARK, 1994). Poucos são os trabalhos que avaliaram os efeitos da exposição de drogas ou procedimentos sobre as taxas de fertilidade das ratas Wistar.

Estudo publicado por Almeida *et al.* (2000) avaliou o efeito do stress em ratos machos da classe *Wistar* sobre as suas taxas de acasalamento e fertilidade. Neste modelo, cada macho era mantido em um tubo plástico por seis horas diárias durante o período diurno (com início por volta das oito horas da manhã) durante 15 dias. Duas horas após o início do ciclo escuro eram colocados cada macho com duas fêmeas, estas em seu ciclo estral, durante 30 minutos para acasalamento. Após, através de esfregaço vaginal a fresco com observação de espermatozoides à microscopia dava-se o diagnóstico de prenhez. Entre as taxas de fertilidade das ratas avaliou-se número e peso de fetos e placentas, número de sítios de reabsorção, taxas de perda pré-implantação, taxas de perda pós-implantação, taxa de viabilidade fetal e taxa de eficiência de implantação. No grupo de ratas que cruzaram com ratos do grupo estresse, observaram-se maiores taxas de perda pré e pós-implantação em relação ao controle.

Figueiró-Filho (2002) estudou os efeitos de drogas anti-retrovirais sobre as taxas de fertilidade de ratas Wistar. As drogas estudadas neste trabalho foram a azidotimidina (AZT), Lamivudina (3TC) e nelfinavir (NFV), com as dosagens respectivas de 25mg, 12,5mg e 97,5mg/dia, administradas em associação ou de forma isolada. Cada grupo era composto por dez ratas. O início do uso destas drogas foi o dia “zero” da prenhez, confirmada através de esfregaço vaginal e observação de espermatozoides na microscopia. Após 21 dias de gestação,

as ratas eram submetidas à histerectomia em bloco e eutanasiadas em sequência. As taxas de fertilidade que incluíam as taxas de eficiência de implantação, taxas de perda pré-implantação e taxas de perda pós-implantação, além da contagem de corpos lúteos, sítios de reabsorção, número e peso de fetos e placentas. Como resultados, observou-se que nos grupos tratados com drogas antirretrovirais isoladas ou associadas houve maior taxa de perda pós-implantação, menor taxa de viabilidade fetal, menor número de fetos e redução do peso materno, todos com diferença significativa em relação ao grupo controle.

Outro trabalho nesta linha de avaliação das taxas de fertilidade foi publicado por Castro *et al.* (2005) que buscaram avaliar os efeitos da *Gingko-biloba* com dose 10x superior a recomendada sobre as taxas de fertilidade de ratos *Wistar*. Após distribuição em dois grupos com dez ratas e dez ratos cada, foram tratados desde a fase pré-acasalamento com solução fisiológica (SF) ou com *Gingko-biloba* via oral. Não houve alterações nas taxas de fertilidade e no desenvolvimento ponderal das ratas. Não houve alterações de massa dos órgãos internos dos animais e análise do líquido seminal dos machos também não teve diferenças em relação ao grupo controle.

Em um dos mais recentes trabalhos encontrados avaliou-se os efeitos da exposição de ratas *Wistar* a um fitoterápico similar aos estrógenos (fitoestrogênio) sobre as taxas de fertilidade (HOLLENBACH, 2008). O fitoterápico em questão era derivado de soja com comportamento semelhante aos estrogênios. Foram oito ratas em cada grupo, sendo um controle e três grupos com doses maiores progressivas de cada fitoterápico. O início do uso do fitoterápico ocorreu sete dias em média, antes do início da prenhez. Houve aumento do número de reabsorções e menor taxa de acasalamento, além de maior taxa de perdas pós-implantação nos grupos tratados com fitoterápicos em comparação ao grupo controle.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas, sobre a prenhez de ratas *Wistar*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre o desenvolvimento ponderal das ratas em seu período gestacional.

3.2.2 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre as seguintes taxas de fertilidade:

- Taxas de perdas pré-implantação (TPP)
- Taxas de eficiência de implantação (TEI)
- Taxas de perdas pós-implantação (TPPI)
- Taxas de viabilidade fetal (TVF)

3.2.3 Verificar a ocorrência das seguintes complicações relacionadas a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas:

- Plaquetopenia
- Eventos hemorrágicos

3.2.4 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre os seguintes parâmetros perinatais das crias:

- Peso dos fetos
- Número de fetos por ninhada
- Taxas de masculinidade
- Taxas de feminilidade

4 HIPÓTESES

4.1. Hipótese de Nulidade (H0):

Os anticoagulantes não comprometem o prognóstico perinatal e as taxas de fertilidade em ratas prenhes tratadas com estes fármacos, tanto em dose profilática, quanto terapêutica.

4.2 Hipótese alternativa (H1):

Os anticoagulantes podem comprometer o prognóstico perinatal e as taxas de fertilidade em ratas prenhes tratadas com estes fármacos em suas doses profilática e ou terapêutica.

5 MATERIAL, ANIMAIS E MÉTODOS

Estudo experimental realizado no Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande, com a utilização de 55 animais da espécie *Rattus norvegicus* da variedade *Wistar*, sendo 50 fêmeas e cinco machos, com peso inicial entre 160 e 250g provenientes do próprio biotério central do campus de Campo Grande da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O tamanho amostral mínimo calculado das ratas fêmeas foi de oito animais por grupo. Com objetivo de minimizar perdas, optou-se por usar dez animais em cada grupo, conforme utilizado por Figueiró-Filho *et al.* (2002) e Castro *et al.* (2005). Em relação ao número de machos optou-se por um macho para cada cinco fêmeas, conforme modelo descrito por Weinstein e Stark (1994) e utilizado por Figueiró-Filho *et al.* (2002).

O número de machos foi estipulado pela aceitação habitual de um grupo de três a cinco fêmeas por macho e pela capacidade da gaiola, que acomodava no máximo cinco animais (WEINSTEIN; STARK, 1994). Assim, em cada dia, poder-se-ia colocar um macho em gaiolas com duas a três fêmeas até se obter a prenhez de cada rata. Os ratos machos foram utilizados apenas para a finalidade de procriação e assim, iniciar a fase experimental. Após a conclusão de todos os acasalamentos os ratos machos foram encaminhados para descarte pelo biotério através de eutanásia por intoxicação por monóxido de carbono.

Além do modelo experimental já existente, colaborou para a escolha destes animais o fato de sua fácil reprodutividade (ciclo estral médio de cinco dias), período gestacional de 21 dias, disponibilidade no Biotério e condições propícias no mesmo para manejo, manutenção e descarte.

Os medicamentos utilizados neste experimento foram fornecidos pela Farmácia do Núcleo Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e suas doses

foram padronizadas em relação à literatura, cujas doses preconizadas são as mesmas empregadas em seres humanos ajustadas ao peso (SARDINHA, SILVESTRE, 2006; THOMAS; VILLAS, 2006; CURCELLY, 2005; SHAUGHNESSY, 1999). Como o peso dos animais é bem inferior ao do ser humano realizou-se diluição das apresentações farmacêuticas da enoxaparina e da HNF para ficar compatível com volume de administração adequado às ratas (PAIVA, 2005). Desta forma, as doses e vias de administração foram as seguintes:

- Enoxaparina, dose profilática: 1mg/Kg subcutâneo, dose única diária.
- Enoxaparina, dose terapêutica: 2mg/Kg subcutâneo, dose dividida em duas tomadas diárias.
- Heparina não fracionada, dose profilática: 72UI/Kg subcutâneo, em duas tomadas diárias.
- Heparina não fracionada, dose terapêutica: 200UI/Kg subcutâneo, em duas tomadas diárias.

No último grupo, a eficácia da anticoagulação era mensurada por meio do exame de tempo da tromboplastina parcial ativada (TTPa), cujo valor entre 1,5 e 2,5 equivale a uma anticoagulação adequada. A correção da dose está expressa no anexo B.

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos, nomeados de I a V, sendo o grupo I o controle e os demais (II a V) os grupos experimentos. Cada grupo foi composto por dez animais. Não houve perdas durante a pesquisa.

Os grupos foram discriminados de acordo com o anticoagulante utilizado. Assim tivemos os grupos enoxaparina que recebiam dose profilática (grupo II) e terapêutica (grupo III) e os grupos heparina não fracionada, expostos a doses profilática (grupo IV) e terapêutica (grupo V), conforme é ilustrada pela figura 2.

Grupo	Medicamento testado	Dose/ uso	Total de animais
I	Soro fisiológico (controle)	Máximo de 4ml/Kg*	10
II	Enoxaparina	1 mg/Kg 1x dia (Profilático)	10
III	Enoxaparina	1 mg/Kg 2x dia (Terapêutico)	10
IV	Heparina não fracionada (HNF)	72UI/Kg 2x dia (Profilático)	10
V	Heparina não fracionada (HNF)	200UI/Kg 2x dia** (Terapêutico)	10
Total			50

Figura 2: Distribuição dos animais em grupos e drogas utilizadas

Forma de administração: subcutânea.

Tempo de tratamento: 21 dias, sendo dia 1, o dia “zero” da prenhez.

* Utilizou-se um volume médio correspondente ao dos demais grupos, de acordo com o peso animal (PAIVA, 2005). ** Dose inicial, ajustada no transcorrer do estudo conforme TTPa (Anexo B)

Os animais permaneceram em gaiolas adequadas, abrigados em boa temperatura e umidade e com respeito à luminosidade do seu ciclo natural em estantes próprias com este controle, disponíveis no Biotério, além de água e comida *ad libitum*. O período de adaptação dos ratos em seus novos ambientes antes da fase experimental se deu com um tempo de sete dias por grupo de animais em cada gaiola. Os machos foram acondicionados em uma gaiola separada, também com um período de adaptação de sete dias e em mesmas condições alimentares e ambientais que as fêmeas.

Após o período de adaptação, iniciou-se o programa de acasalamento. Diariamente, pela manhã após a limpeza das gaiolas realizava-se a observação à fresco através de microscopia óptica de uma lâmina obtida por esfregaço vaginal. Nesta observação colpocitológica procurava-se saber em qual fase do ciclo estral cada rata se encontrava. O ciclo estral das ratas dura entre quatro e seis dias e é classificado em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. A fêmea se encontra receptiva ao macho apenas na fase do estro (WEINSTEIN; STARK, 1994). Por isso, quando se identificava uma rata no estro, esta era separada para receber o macho naquele dia. Na maioria das gaiolas as ratas tiveram ciclos concordantes, ou seja, numa mesma gaiola se encontrava mais de uma rata na mesma fase do ciclo.

No dia da fase estral, colocavam-se os machos para acasalar após duas horas do início do ciclo escuro de luminosidade, onde permaneciam por cerca de uma hora e depois eram retirados e realocados em sua gaiola. Na manhã seguinte, novo esfregaço vaginal das ratas submetidas ao acasalamento e a observação de espermatozoide na lâmina confirmava o diagnóstico de prenhez, definido como indicador do dia “zero” da prenhez (CAMANO, 1968). Com a confirmação cada rata era alocada aleatoriamente por sorteio a um dos grupos do presente estudo, com início da experimentação.

Diariamente, as ratas eram pesadas e de acordo com seu peso, checava-se a dose a ser administrada. Também, realizava-se diariamente, através de observação direta, a pesquisa de sangramentos em região gengival, ocular, genital e no aspecto das fezes (em busca de hematoquezia e ou melena), além da pesquisa de hematomas corporais. Os experimentos foram realizados pela manhã e ao final da tarde, com intervalo de 12 horas, correspondente ao intervalo de aplicação das medicações em alguns grupos.

A via subcutânea utilizada nos ratos foi a nuca ou o dorso do animal, após contenção manual suave (PAIVA, 2005). O volume aplicado não ultrapassou o limite estabelecido na

literatura para uso da via subcutânea em ratos, que é de 4ml/Kg, o que corresponde em média a um volume na nuca ou dorso de 0,6ml num rato de 150g a 1,2ml num rato de 300g (SILVA; PESGRAVE, 2008; PAIVA, 2005). A diluição das drogas com a dose necessária se fez para obedecer este volume máximo.

Durante o período de tratamento, o grupo (V) teve pela manhã, além da aplicação do medicamento, a realização de coleta de sangue venoso da veia caudal para controle laboratorial de ajuste da dose da heparina não fracionada, com o exame de tempo da tromboplastina parcial ativada (TTPa), cuja tabela de ajuste de dose encontra-se no anexo B. Realizou-se no 2º, 7º, 14º e 21º dia de gestação a coleta de sangue venoso caudal, de todas as fêmeas, para contagem plaquetária, que era realizada no laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Na manhã do 21º dia de gestação submeteu-se cada rata ao procedimento cirúrgico de laparotomia com objetivo de retirada de órgãos e dos fetos. Para a realização da laparotomia, realizava-se a indução pré-anestésica com midazolam 4mg/Kg IM, seguida de anestesia geral com xilazina (5-10 mg/Kg) com adição de quetamina (50-75 mg/Kg) por via intraperitoneal (IP). Em seguida ao procedimento cirúrgico, realizou-se eutanásia com Pentobarbital IP na dose de 100mg/Kg (SILVA; PESGRAVE, 2008; PAIVA, 2005).

As etapas experimentais contemplaram: imediatamente após a anestesia geral do animal (Fig. 3), procedeu-se a realização da laparotomia. Após rápido inventário da cavidade, isolou-se os cornos uterinos e os ovários (Fig. 4), retirando-os em bloco com secção da base uterina e dos ligamentos uterinos e apendiculares ovarianos (Fig. 5). Realizou-se a abertura uterina e uma vez aberto o útero, eram retirados e contados os fetos e placentas, seguido da observação direta do sexo de cada feto, pesagem dos mesmos e de suas respectivas placentas (Fig. 6 e 7).

Os fetos foram submetidos à eutanásia por meio de intoxicação em câmara de monóxido de carbono, disponível no biotério (SILVA; PESGRAVE, 2008).



Figura 3 – Rata anestesiada, posicionada antes do procedimento cirúrgico

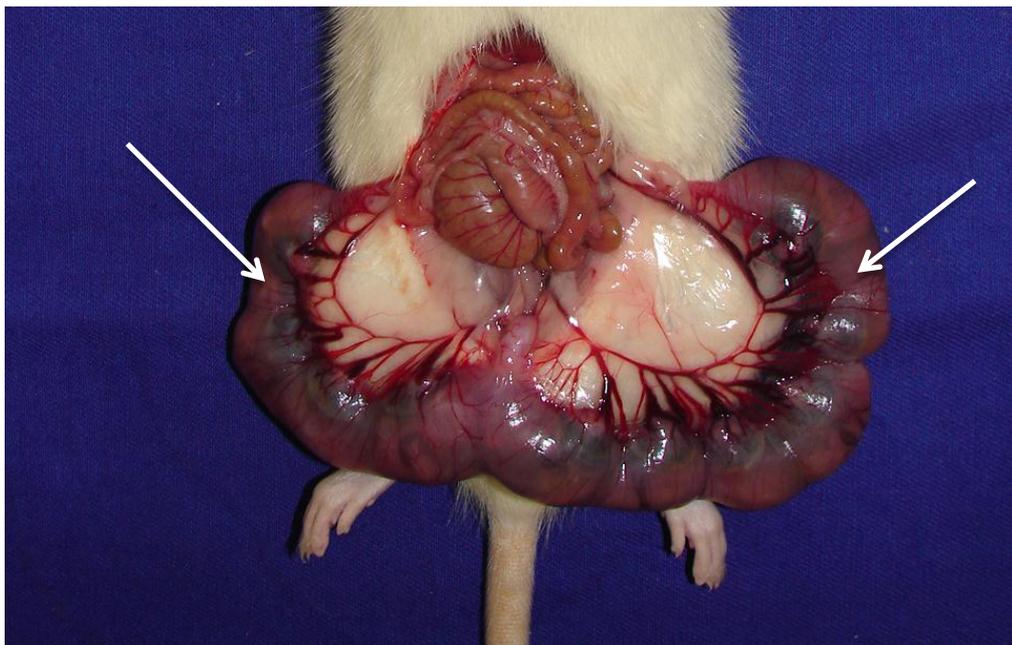


Figura 4 – Cornos uterinos (setas) com a presença dos fetos e placentas com 21 dias de prenhez.



Figura 5 – Cornos uterinos retirados “em bloco” com a presença de fetos (F) e respectivas placentas (P) com 21 dias de prenhez.

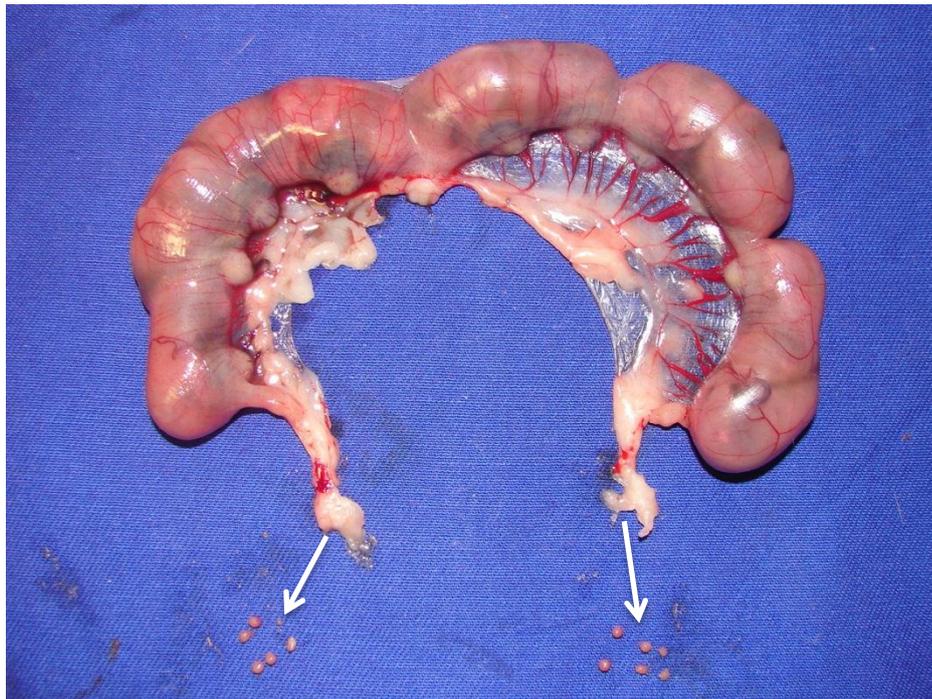


Figura 6 – Cornos uterinos íntegros com fetos em prenhez de 21 dias evidenciando a diferença de tamanho dos fetos. Corpos lúteos individualizados (setas).

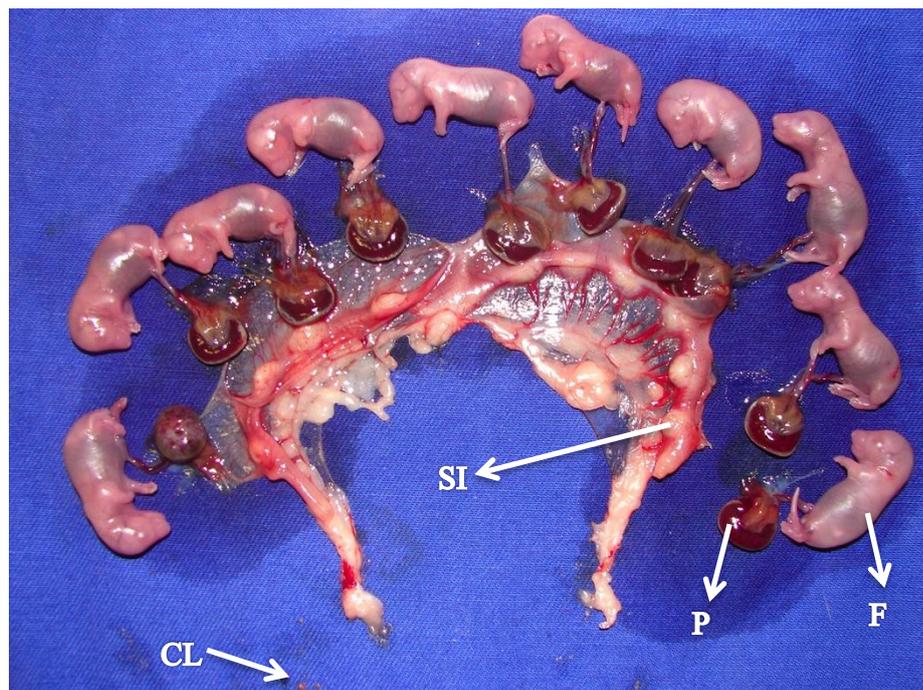


Figura 7 – Cornos uterinos abertos evidenciando os fetos (F), placentas (P), sítios de implantação (SI) e corpos lúteos (CL) após 21 dias de prenhez.

Em seguida, os ovários foram removidos da peça cirúrgica para contagem dos corpos lúteos (indicativos do número de ovulações), reconhecidos pela cor rósea, forma arredondada medindo cerca de 2mm. Com os valores obtidos, efetuavam-se os seguintes cálculos para análise da fertilidade (WEINSTEIN; STARK, 1994; FIGUEIRÓ-FILHO, 2002):

- **Taxa de perdas pré-implantação:**

$$\frac{\text{Total de corpos lúteos} - \text{total sítios de implantação} \times 100}{\text{Total de corpos lúteos}}$$

- **Taxa de eficiência de implantação:**

$$\frac{\text{Total de sítios de implantação} \times 100}{\text{Total de corpos lúteos}}$$

- **Taxa de perdas pós-implantação:**

$$\frac{\text{Total de sítios de implantação} - \text{total fetos vivos} \times 100}{\text{Total de sítios de implantação}}$$

- **Taxa de viabilidade fetal:**

$$\frac{\text{Total de fetos vivos} \times 100}{\text{Total de sítios de implantação}}$$

- **Taxa de masculinidade/feminilidade:**

$$\frac{\text{Total de machos ou fêmeas} \times 100}{\text{Total de fetos}}$$

Para análise estatística de variáveis paramétricas com distribuição normal e variâncias semelhantes como peso dos animais prenhes, número de fetos, peso dos fetos e placentas foi utilizado o teste “t” de Student para comparação de dois grupos. Para comparação de três ou mais grupos com as mesmas variáveis utilizou-se o teste ANOVA (análise de variâncias) com aplicação de pós-teste de Newman-Keuls quando necessário.

Para análise de variáveis não paramétricas como taxas de fertilidade dos animais, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos. Quando se comparou três ou mais grupos com as mesmas variáveis, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com realização de pós-teste de Dunn, quando necessário.

Para avaliação das frequências de eventos hemorrágicos utilizou-se o teste exato de Fisher.

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de “p” bicaudal foi menor que 0,05. Para a análise de variância considerou-se a razão *F* de variância calculada com a razão *F* tabelada e se diferente de 1 rejeitava-se a H_0 . Para a realização dos cálculos foi utilizado o *software* GraphPad Prism® versão 3.00.

O presente trabalho foi aprovado na comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) com protocolo nº 282 de 11/03/2011.

6 RESULTADOS

Os dados foram submetidos à análise estatística e as variáveis com distribuição normal estão expressas na forma de **média ± 1 desvio padrão (DP) ($\mu. \pm 1 DP$)**. As variáveis não paramétricas como as taxas de fertilidade, estão expressas na forma de **mediana P25-P75 (M P25-P75)**. Seguem abaixo os resultados do presente estudo:

Quanto à variável ganho de peso, através dos dados expressos nas tabelas 1, 2 e 3, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de ganho de peso diário após 7, 14 e 21 dias de prenhez respectivamente, tanto em relação de cada grupo com o grupo controle (onde se utilizou o teste *t* de student) quanto quando se relacionou cada grupo entre si (neste caso se usou a ANOVA).

Tabela 1 – Médias do ganho de peso diário após 7 dias de prenhez

Grupo	Ganho de peso (g) ($\mu. \pm 1 DP$)	<i>p</i> *
I- Controle	6,98±0,87	---
II- Enoxaparina, dose profilática	6,75±0,69	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	6,82±1,13	n.s.
IV- HNF, dose profilática	6,94±1,31	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	6,75±0,98	n.s.

* *p*<0,05 “t” Student (grupo X controle). ANOVA (grupos entre si).

Tabela 2 – Médias do ganho de peso diário após 14 dias de prenhez

Grupo	Ganho de peso (g) (μ . \pm 1 DP)	p^*
I- Controle	7,04 \pm 0,82	---
II- Enoxaparina, dose profilática	6,92 \pm 0,78	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	6,98 \pm 0,83	n.s.
IV- HNF, dose profilática	7,23 \pm 0,35	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	7,13 \pm 0,69	n.s.

* $p < 0,05$ “t” Student (grupo X controle). ANOVA (grupos entre si).

Tabela 3 – Médias do ganho de peso diário após 21 dias de prenhez

Grupo	Ganho de peso (g) (μ . \pm 1 DP)	p^*
I- Controle	8,22 \pm 1,32	---
II- Enoxaparina, dose profilática	8,19 \pm 1,08	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	7,92 \pm 1,51	n.s.
IV- HNF, dose profilática	8,27 \pm 1,25	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	7,94 \pm 1,42	n.s.

* $p < 0,05$ “t” Student (grupo X controle). ANOVA (grupos entre si).

Quando se observa a tabela 4, onde são comparados os ganhos ponderais de cada grupo nos diversos períodos de prenhez, observa-se que todos os animais em todos os grupos aumentaram de peso significativamente durante a prenhez de forma satisfatória, com exceção do grupo IV, que entre 7 e 14 dias foi o único a apresentar ganho ponderal médio mais significativo.

Tabela 4 – Médias do ganho de peso diário nos diferentes períodos de prenhez

	Ganho de peso (g)			<i>p</i> *		
	(μ. ± 1 DP)					
	7 dias	14 dias	21 dias	7 d X14 d	14 d X 21 d	7 d X 21 d
Controle	6,98±0,87	7,04±0,82	8,22±1,32	n.s.	0,034	0,023
II	6,75±0,69	6,92±0,78	8,19±1,08	n.s.	0,018	<0,01
III	6,82±1,13	6,98±0,83	7,92±1,51	n.s.	0,042	0,031
IV	6,94±1,31	7,23±0,35	8,27±1,25	0,045	0,027	<0,001
V	6,75±0,98	7,13±0,69	7,94±1,42	n.s.	0,021	0,022

* *p*<0,05 ANOVA

Quanto às taxas de fertilidade, não foi encontrada significância estatística entre cada grupo com o grupo controle e os grupos entre si ao se analisar as taxas de perda pré-implantação (TPP) após os 21 dias de prenhez, como demonstra a tabela 5.

Tabela 5 – Taxas de perda pré-implantação (TPP) após 21 dias de prenhez

Grupo	% TPP (M P25-P75)	<i>p</i> *
I- Controle	11,70 (7,80-15,60)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	12,25 (10,40-14,50)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	12,10 (9,50-13,80)	n.s.
IV- HNF, dose profilática	11,80 (7,30-16,40)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	11,60 (7,90-14,30)	n.s.

* *p*<0,05 Mann-Whitney (grupo X controle) e Kruskal-Wallis (grupos entre si)

Em relação às Taxas de eficiência de implantação (TEI), a tabela 6 demonstra que não houve diferenças significantes entre os grupos com o grupo controle e os grupos entre si após

21 dias de prenhez. O mesmo pode se dizer sobre as Taxas de perda pós-implantação (TPPI) entre os grupos, conforme pode ser observado na tabela 7.

Tabela 6 – Taxas de eficiência de implantação (TEI) após 21 dias de prenhez

Grupo	% TEI (M P25-P75)	<i>p</i> *
I- Controle	88,70 (80,70-93,60)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	85,60 (81,50-94,80)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	86,20 (84,20-91,40)	n.s.
IV- HNF, dose profilática	89,80 (83,60-93,30)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	88,40 (84,50-92,30)	n.s.

* $p < 0,05$ Mann-Whitney (grupo X controle) e Kruskall-Wallis (grupos entre si)

Tabela 7 – Taxas de perda pós-implantação (TPPI) após 21 dias de prenhez

Grupo	% TPPI (M P25-P75)	<i>p</i> *
I- Controle	7,20 (6,30-18,7)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	7,10 (6,30-11,50)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	8,40 (5,40-22,70)	n.s.
IV- HNF, dose profilática	7,70 (6,70-14,10)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	8,12 (6,50-15,8)	n.s.

* $p < 0,05$ Mann-Whitney (grupo X controle) e Kruskall-Wallis (grupos entre si)

A tabela 8 põe em evidência as taxas de viabilidade fetal (TVF), onde nota-se que não ocorreram diferenças significantes entre os grupos com o grupo controle e entre si.

Tabela 8 – Taxas de viabilidade fetal (TVF) após 21 dias de prenhez

Grupo	% TVF (M P25-P75)	<i>p</i> *
I- Controle	91,60 (83,70-93,60)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	92,30 (88,50-94,70)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	89,70 (78,90-94,80)	n.s.
IV- HNF, dose profilática	88,60 (83,90-92,40)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	88,20 (81,40-93,70)	n.s.

* $p < 0,05$ Mann-Whitney (grupo X controle) e Kruskal-Wallis (grupos entre si)

Ao se analisar outras características da ninhada com os efeitos das drogas anticoagulantes empregadas neste estudo sobre o prognóstico perinatal, como peso dos fetos e das placentas e taxas de masculinidade e feminilidade construíram-se as tabelas 9 a 12. As Tabelas 9 e 10 mostram não haver diferenças significativas nas taxas de masculinidade e feminilidade entre os grupos com o grupo controle e entre si.

Tabela 9 – Taxas de masculinidade (TM) após 21 dias de prenhez

Grupo	% TM (M P25-P75)	<i>p</i> *
I- Controle	45,80 (45,50-60,00)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	50,00 (40,00-50,00)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	46,20 (30,80-53,80)	n.s.
IV- HNF, dose profilática	48,00 (35,70-54,50)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	52,00 (50,00-54,50)	n.s.

* $p < 0,05$ Mann-Whitney (grupo X controle) e Kruskal-Wallis (grupos entre si)

Tabela 10 – Taxas de feminilidade (TF) após 21 dias de prenhez

Grupo	% TF (M P25-P75)	<i>p</i> *
I- Controle	54,20 (50,00-54,50)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	50,00 (50,00-56,20)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	53,80 (46,20-61,50)	n.s.
IV- HNF, dose profilática	52,00 (45,50-54,50)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	48,00 (40,00-63,60)	n.s.

* $p < 0,05$ Mann-Whitney (grupo X controle) e Kruskal-Wallis (grupos entre si)

Quando se compara o número de fetos por animal prenhe, não se observou diferenças significativas no tamanho da ninhada entre os grupos com o grupo controle e entre si, como apresentado na tabela 11.

Tabela 11 – Médias do número de fetos/animal após 21 dias de prenhez

Grupo	Número fetos/animal (μ . \pm 1 DP)	<i>p</i> *
I- Controle	12,82 \pm 2,34	---
II- Enoxaparina, dose profilática	11,98 \pm 1,78	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	12,23 \pm 1,94	n.s.
IV- HNF, dose profilática	12,57 \pm 2,03	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	12,34 \pm 1,56	n.s.

* $p < 0,05$ "t" Student (comparação grupo X controle)

*ANOVA (comparação dos grupos entre si)

Após 21 dias de prenhez, não se observou redução estatisticamente significativa dos pesos dos fetos entre cada grupo e o grupo controle ou os grupos entre si (Tabela 12), assim como os pesos das placentas (Tabela 13).

Tabela 12 – Médias do peso dos fetos após 21 dias de prenhez

Grupo	Peso feto (g) (μ . \pm 1 DP)	<i>p</i> *
I- Controle	5,62 \pm 0,78	---
II- Enoxaparina, dose profilática	6,01 \pm 0,24	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	5,83 \pm 0,62	n.s.
IV- HNF, dose profilática	5,67 \pm 0,55	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	5,72 \pm 0,81	n.s.

* $p < 0,05$ “t” Student (comparação grupo X controle)

*ANOVA (comparação dos grupos entre si)

Tabela 13 – Médias do peso das placentas após 21 dias de prenhez

Grupo	Peso placenta (g) (μ . \pm 1 DP)	<i>p</i> *
I- Controle	0,83 \pm 0,18	---
II- Enoxaparina, dose profilática	0,81 \pm 0,15	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	0,83 \pm 0,22	n.s.
IV- HNF, dose profilática	0,84 \pm 0,17	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	0,82 \pm 0,23	n.s.

* $p < 0,05$ “t” Student (comparação grupo X controle)

*ANOVA (comparação dos grupos entre si)

Sobre a frequência de eventos hemorrágicos, houve prevalência significativamente maior nos grupos expostos a doses terapêuticas de drogas anticoagulantes (grupos III e V) em comparação com o grupo controle, como se observa na tabela 14. Todos os eventos hemorrágicos aconteceram entre um e quatro dias antes da cirurgia programada (entre 18 a 21 dias de gestação). Não houve perdas na amostra. Os sangramentos notificados foram: sangue na região genital (dois casos), melena (um caso), sangue em cavidade oral/ gengiva (dois

casos) e hematoquezia (um caso). Nestes casos, suspendeu-se por 24h a medicação e reiniciado em dose cerca de 10 a 20% menor.

Tabela 14 – Frequência de animais que apresentaram eventos hemorrágicos após 21 dias de prenhez

Grupo	Ocorrência de evento hemorrágico na amostra		<i>p</i> *
	%	(x/n)	
I- Controle	00,00%	(0/10)	---
II- Enoxaparina, dose profilática	10,00%	(1/10)	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	30,00%	(3/10)	0,046
IV- HNF, dose profilática	00,00%	(0/10)	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	20,00%	(2/10)	0,048

* $p < 0,05$ teste exato de Fisher

Em relação à ocorrência de trombocitopenia, não foi encontrado nenhum caso de plaquetopenia (número de plaquetas $< 130.000/\text{mm}^3$ de sangue venoso periférico) nos animais da amostra, em nenhuma das três coletas de sangue para avaliar a contagem plaquetária (realizadas ao final de cada semana de prenhez das ratas, que equivale a cada trimestre gestacional humano), sem diferenças significativas das médias dos números de plaquetas entre os grupos e o grupo controle e os grupos entre si, em cada período estudado (2º, 7º, 14º e 21º dia de prenhez) conforme se observa na tabela 15.

Tabela 15 – Médias de contagem plaquetária dos animais durante 21 dias de prenhez

Grupo	Contagem plaquetária [n (x1000)/mm ³]							
	2º dia de prenhez ($\mu. \pm 1$ DP)		7º dia de prenhez ($\mu. \pm 1$ DP)		14º dia de prenhez ($\mu. \pm 1$ DP)		21º dia de prenhez ($\mu. \pm 1$ DP)	
		<i>p</i> *		<i>p</i> *		<i>p</i> *		<i>p</i> *
I	238,2±42,2	---	242,2±33,2	---	238,2±32,2	---	237,2±30,2	---
II	241,1±38,1	n.s.	239,1±36,3	n.s.	242,1±32,1	n.s.	239,9±24,1	n.s.
III	239,9±21,3	n.s.	237,9±33,1	n.s.	240,2±34,4	n.s.	238,8±43,3	n.s.
IV	238,4±25,1	n.s.	240,4±22,4	n.s.	239,1±33,7	n.s.	239,5±37,1	n.s.
V	237,3±32,9	n.s.	239,3±45,1	n.s.	237,9±33,6	n.s.	240,3±31,2	n.s.

* $p < 0,05$ “t” Student (grupo X controle). ANOVA (grupos entre si).

7 DISCUSSÃO

Os termos fecundidade e fertilidade são empregados habitualmente quase como sinônimos, contudo, o primeiro se refere, por definição, à capacidade para reprodução enquanto o segundo se refere à realização da reprodução (FIGUEIRÓ-FILHO, 2002), que pode então, ser mensurada através do seu produto final, ou seja, o número de crias (WEINSTEIN; STARK, 1994). Diante desta premissa, o presente estudo avaliou a fertilidade de ratas prenhes adultas expostas aos anticoagulantes heparina não fracionada (HNF) e heparina de baixo peso molecular (HBPM) ao analisar sua prole gerada do cruzamento com machos adultos normais.

A avaliação das taxas de fertilidade em ratos da classe *Wistar* está bem estabelecida na literatura (FIGUEIRÓ-FILHO, 2002; WEINSTEIN; STARK, 1994), onde se utilizam a análise de parâmetros como as taxas de perdas pré-implantação (TPP), taxas de eficiência de implantação (TEI), as quais refletem a quantidade de óvulos fertilizados e as perdas embrionárias anteriores à implantação endometrial. Também são avaliadas as taxas de perdas pós-implantação (TPPI) e as taxas de viabilidade fetal (TVF), as quais se relacionam às perdas embrionárias e fetais ocorridas após a implantação.

O presente estudo verificou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os animais do grupo controle com aqueles expostos a HNF e a Enoxaparina, tanto em suas doses profiláticas quanto terapêuticas em relação a ganho ponderal e em relação às taxas de fertilidade: TPP, TEI, TPPI e TVF, resultado semelhante encontrado por Castro *et al.* (2005), que avaliou as taxas de fertilidade de ratas expostas ao *Gingko-biloba*.

Não foram encontradas na literatura pesquisas sobre a exposição tanto de dose profilática quanto terapêutica das drogas Heparina e Enoxaparina e a sua relação com taxas de fertilidades de ratas.

Neste tipo de modelo experimental sobre efeitos de drogas sobre as taxas de fertilidade de ratas da classe *Wistar* prenhes, encontrou-se trabalhos relacionados a exposição de antirretrovirais (FIGUEIRÓ-FILHO, 2002), situações de stress aplicados aos ratos machos na fase de pré-acasalamento (ALMEIDA, 2000) e extratos vegetais (CASTRO, 2005; HOLLENBACH, 2008).

A HNF e a enoxaparina são drogas anticoagulantes, sendo que a HNF apresenta atividade sobre a antitrombina e a enoxaparina, uma HBPM, tem atividade em inibir o Fator X ativado da cascata de coagulação. Ambas não atravessam a barreira placentária e por isso tem uso preferencial no período gestacional (BATES, 2012), entretanto, ainda existem controvérsias sobre seu uso, em especial o emprego da enoxaparina, pois não existem grandes ensaios clínicos com estas drogas em gestantes e os trabalhos experimentais são escassos em atestar a segurança e efeitos das heparinas na gestação e em seu produto (VASCONCELOS, 2006).

No presente estudo manteve-se o uso da heparina e da enoxaparina até o dia da eutanásia, esta sendo realizada sempre no período matutino, sem preocupações quanto a hemorragias no transoperatório, visto que se tinha pelo menos 12 horas da última dose. A literatura recomenda a suspensão destas drogas até 12 horas antes do procedimento, quando em suas doses profiláticas e até 24 horas quando de suas doses terapêuticas, desde que o uso seja com administração por via subcutânea (BATES, 2012). Esta recomendação é necessária para reduzir a chance de evento hemorrágico no intra-operatório e pós-operatório. Mesmos os eventos hemorrágicos observados na última semana de prenhez de alguns animais foram poucos e não houve caso de óbito antes do término do estudo. Estes eventos nos grupos expostos a anticoagulantes em doses terapêuticas era esperado, entretanto, houve um caso a mais no grupo exposto à enoxaparina, sabidamente com menos risco de sangramento (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; THOMAS; VILLAS, 2006), onde talvez o ajuste de dose

pelo peso não foi adequado em um dos animais. Em relação a esta mesma dose, os estudos experimentais com ratos expostos a heparinas não se observou relato de sangramentos e as doses utilizadas são as mesmas empregadas nos seres humanos, porém, com diluição para se atingir o volume necessário para administrar nos ratos (ERDEN, 2006; CURCELLI, 2005).

A maioria dos trabalhos sobre exposição de drogas e seus efeitos sobre as taxas de fertilidade em ratas *Wistar* tiveram algum grau de influência sobre as taxas de perdas pré e ou pós-implantação, que se apresentaram aumentadas em relação aos grupos controle (FIGUEIRÓ-FILHO, 2002; ALMEIDA, 2000) e modificações em relação a ganho/ perda ponderal.

Quanto ao desenvolvimento ponderal das ratas prenhes e das crias, como o uso de anticoagulantes não são comuns alterações gastrointestinais que reduzam o habito alimentar das ratas, por isso, a falta de diferenças de perdas/ ganhos ponderais era esperado, ao contrario do uso de medicações anti-retrovirais, que sabidamente provocam mal estar e modificam habito alimentar ou alterações metabólicas hepáticas e pancreáticas e por isso se justifica encontrar perdas ponderais significativas como encontrado no trabalho de Figueiro-Filho (2002). Situações de estresse, como as condicionadas aos ratos machos do estudo de Almeida (2000), podem gerar maior agressividade dos mesmos e modificar seus hábitos sexuais e nas parceiras que ficaram prenhes e assim influenciar a menor fertilidade nos grupos “estressados”.

A trombocitopenia induzida pela HNF e em menor chance, pela enoxaparina, decorre de processo a resposta imunológica e sua ocorrência pode ser precoce ou tardia (SARDINHA; SILVESTRE, 2006) e somente há melhora nos níveis plaquetários após suspensão da administração da heparina ou da enoxaparina. No presente estudo, embora não tenha sido mensurado na mesma frequência do que seria em uma gestação humana (avaliou-se ao início e ao fim de cada equivalente “trimestre” gestacional humano), não foi observado nenhum

caso de plaquetopenia durante toda a pesquisa e em todos os grupos e não houve diferença significativa entre as médias de contagem plaquetária entre os grupos entre si e em relação com o controle.

As drogas empregadas parecem interferir nos processos bioquímicos de implantação e manutenção do embrião de modo positivo, pois várias pesquisas sobre os efeitos das heparinas na invasão e modulação trofoblástica e mecanismos anti-apoptóticos dos tecidos placentários e deciduais demonstram benefício no uso destas medicações (ERDEN, 2006; ZHANG, 2012). Mais uma justificativa para que os resultados do presente estudo não tenham demonstrado diferenças entre as taxas de fertilidade nos grupos de ratas *Wistar* expostas a HNF e a enoxaparina com dose profilática ou terapêutica.

Tanto a HNF quanto a enoxaparina não atravessam a barreira placentária (SARDINHA; SILVEIRA, 2006) e por isso já era esperado não ocorrer diferenças entre o desenvolvimento ponderal dos fetos no presente trabalho.

Deste modo, por não interferir nas taxas de fertilidade das ratas *Wistar*, corrobora-se o uso seguro da HNF e da enoxaparina, em suas doses profiláticas e terapêuticas no período de prenhez destes animais.

8 CONCLUSÕES

Com o presente estudo sobre os efeitos da exposição das ratas *Wistar* a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada (HNF), em doses profiláticas e terapêuticas, em seu período gestacional foi possível concluir que:

Em relação a prenhez em geral:

- Não houve alterações significativas no desenvolvimento da gestação experimental, nas taxas de fertilidade e no prognóstico das crias.

Em relação ao desenvolvimento ponderal:

- Ocorreu adequado ganho de peso desde o início da prenhez, com aumentos significativos entre 7 e 14 dias, 7 e 21 dias e entre 14 e 21 dias.
- Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos e o grupo controle e os grupos entre si em cada período estudado (7, 14 e 21 dias).

Em relação às taxas de fertilidade:

- Não houve diferenças estatísticas nas **Taxas de Perdas Pré-Implantação, Taxas de Eficiência de Implantação, Taxas de Perdas Pós-Implantação e Taxas de Viabilidade Fetal** entre os grupos com o grupo controle e os grupos entre si.

Em relação à ocorrência de complicações relacionadas à exposição aos anticoagulantes:

- Não houve casos de **plaquetopenia** nas ratas prenhes expostas à Enoxaparina e Heparina não fracionada em doses profilática e terapêutica e não houve diferenças

significativas das médias de contagem plaquetária entre os grupos entre si e em relação ao controle.

- Houve um numero maior de ratas que apresentaram pelo menos um **evento hemorrágico** ao final dos 21 dias de prenhez nos grupos expostos à Enoxaparina e Heparina não fracionada em doses terapêuticas.

Em relação ao prognóstico peri-natal das crias:

- Não houve redução do **peso dos fetos** entre os grupos.
- Não houve redução do **numero de fetos por ninhada** entre as ratas *Wistar*.
- Não houve diferenças estatísticas quanto às **Taxas de masculinidade e de feminilidade** nas crias das ratas prenhes expostas à Enoxaparina e Heparina não fracionada em doses profilática e terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida SA, Kempinas WG, Carvalho TL. Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33:1105-9.

Almeida SA. Efeitos do estresse de imobilização sobre as funções reprodutoras do rato macho púbere adulto. [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1999.

Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabalus AM, Vandvik PO. Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy. American College of Chest Physicians Evidence-Based clinical practice guidelines (8th edition) *CHEST.* 2012; 141 (2) (Supl):e691S-e736S.

Brenner B, Hoffman Z, Blumenfeld Z, Weiner Z, Younis JS. Gestacional outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost* 2000; 83:693-7.

Brenner B, Hoffman R, Carp H, et al. Efficacy and safety of two doses of enoxaparin in women with thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the LIVE-ENOX study. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:227-9.

Camano L. contribuição para o estudo histoquímico do muco do epitélio vaginal de rata (*Rattus norvegicus var. albins, Rodentia, Mammalia*), no ciclo estral, na prenhez e na pós-parturição. [Dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1968.

Castro AP, Mello FB, Mello JR. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005; 33(3):265-269.

Curcelli E, Muller SS, Ueda AK, Padovani CR, Maffei FHA, Hossne WS. Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura da tíbia no rato: avaliação clínica e anatomopatológica e biomecânica. *Acta Ortop Bras*. 2005; 13(1): 13-16.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116:205-19.

Deepa PR, Varalakshmi P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact*. 2003; 146(2): 201-10.

Deepa PR, Varalakshmi P. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology*. 2006; 217(2-3): 176-83.

Dimitrakakis C, Papageorgiou P, Papageorgiou I, Antzaklis A, Sakarelou N, Michalas S. Absence of transplacental passage of the low molecular weight heparin enoxaparin. *Haemostasis*. 2000;30(5):243-8.

Erden O, Imir A, Guvenal T, Muslehiddinoglu A, Arici S, Celtin M. Investigation of the effects of heparin and low molecular weight heparin on E-cadherin and laminin expression in rat pregnancy by immunohistochemistry. *Human Reproduction*. 2006; 21(11): 3014-30.

Figueiró-filho EA, Duarte G, Rosa e Silva AAM, Fonseca BAL, Mussi-Pinhata MM, Quintana SM *et al.* Efeito das drogas anti-retrovirais sobre as taxas de fertilidade de ratas Wistar. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2002; 24(10): 647-652.

Figueiró-Filho EA, Oliveira VM. Associação entre abortamentos recorrentes, perdas fetais, pré-eclâmpsia grave e trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em mulheres do Brasil Central. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007; 29(11):561-7.

Figueiró-Filho EA, Oliveira VM, Coelho LR, Breda I. Marcadores séricos de trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em gestantes com antecedentes de pré-eclâmpsia grave. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012; 34(1):40-6.

Ginsberg JS. Thromboembolism and pregnancy. *Thromb Haemost.* 1999; 82(2):620–5.

Hayashi M, Inoue T, Hoshimoto K, Hirabayashi H, Negishi H, Ohkura T. the levels of Five markes of hemostasis and endothelial status at diferrent stages of normotensive pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81(3):208-13.

Hellgren M. Haemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost.* 2003; 29:125–30.

Hirsh J. Oral anticoagulant drugs. *N Engl J Med.* 1991a; 324: 1865-75.

Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med.* 1991b; 324: 1565-74.

Hollembach CB, Bortolini CE, Batista JM, Hollenbach EB, Schuch TL, Pacheco MH *et al.* Avaliação da fertilidade de ratas wistar tratadas com preparação fitoterápica comercial à base de soja *Glycine max* (L.) Merr. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul. 2008. Disponível em URL:
<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/407.pdf>

Kemkes-matthes J. Changes in the blood coagulation system in pregnancy. *Z Kardiol*. 2001; 90(4): 45–8.

Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191(2):414-424.

Lockwood CJ. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. *Obstet Gynecol*. 2002; 99(2):333-41.

Monga M, Doyle NM. Thromboembolic disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2004; 31(2):319-44.

Oliveira VM. Associação entre a presença de trombofilias adquiridas e Hereditárias e a ocorrência de abortamentos recorrentes, perdas fetais em gestantes de alto risco. [Dissertação]. Campo Grande: Faculdade de Medicina “Dr. Helio Mandetta”, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2010.

O’Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003; 17: 385–96.

Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Apostila do Curso de manipulação de animais de laboratório. Salvador: Ministério da Saúde- FIOCRUZ. 2005; 13-22. Disponível em URL: <www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf>.

Piercy CN, Letsky EA, de Swiet M. Low-molecular-weight heparin for obstetric thromboprophylaxis: Experience of sixty-nine pregnancies in sixty-one women at high risk. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:1062-8.

Robin F, Lecuru F, Desfeux P, Boucaya V, Taurelle R. Anticoagulant therapy in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999; 83(2): 171–177.

Sanson BJ, Lensing AW, Prins MH. Safety of low-molecularweight heparin in pregnancy: a systematic review. *Thromb Haemost.* 1999; 81(5): 668–72.

Sardinha WE, Silvestre JM. Anticoagulantes e fibrinolíticos. In: Thomaz JB, Belczak CEQ. *Tratado de flebologia e linfologia.* Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2006. p. 511-31.

Shaughnessy S, Hirsh J, Bhandari M, Muir JM, Young E Weitz JI. A. A Histomorphometric Evaluation of Heparin-Induced Bone Loss After Discontinuation of Heparin Treatment in Rats. *Blood.* 1999; 93: 1231-1236.

Shefras J, Farquharson RG. Bone density studies in pregnant women receiving heparin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996; 65(2):171–4.

Silva CF, Pesgrave OAF. *Manual de utilização de animais/FIOCRUZ.* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. 2008.

Silveira PRM. Trombose venosa profunda e gestação: aspectos etiopatogênicos e terapêuticos. *J Vasc Bras.* 2002; 1(1): 65-70.

Simard JM, Tosun C, Ivanova S, Kurland DB, Hong C, Radecki L et al. Heparin Reduces Neuroinflammation and Transsynaptic Neuronal Apoptosis in a Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* 2012; 3 (Suppl 1):S155–S165.

Thomas JB, Villas JD. Trombose venosa profunda dos membros inferiores. In: Thomaz JB, BELCZAK CEQ. *Tratado de flebologia e linfologia.* Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2006. p.567-77.

Uchikova E.H, Ledjev I.I. Changes in haemostasis during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 119:185–188.

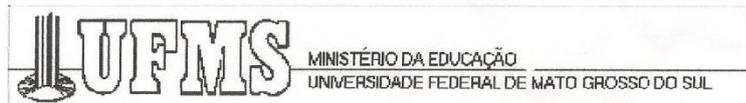
Vasconcelos PRC, Carvalho AR, Gomes SCN. Profilaxia e tratamento do tromboembolismo no ciclo grávido-puerperal. In: Thomaz JB, Belczak CEQ *Tratado de flebologia e linfologia.* Rio de Janeiro: Editora Rubio. 2006. p.579-600.

Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med.* 1995; 332 (20):1330–5.

Weinstein M, Stark M. Behavioral and biological determinants of fecundability. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 709 (18): 128-144.

Yu TG, Zhang QZ, Zhang ZG. Protective effect of ultra low molecular weight heparin on glutamate-induced apoptosis in cortical cells. *Yonsei Med J.* 2008; 49(3): 486-95.

Zhang Y, Zhong M, Liu F. Low molecular weight heparin inhibits cell apoptosis in the placenta of rats with preeclampsia-like symptoms. *J South Med Univ.* 2012; 32 (6): 862-866.

ANEXOS**ANEXO A- Aprovação do Comitê de ética.****C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº 282 do Pesquisador Ernesto Antônio Figueiró Filho referente ao projeto de pesquisa, **“Efeitos osteopênicos, trombocitopênicos, teratogênicos e sobre as taxas de fertilidade das ratas Wistar prenhes expostas à enoxaparina e à heparina não fracionada em doses profilática e terapêutica”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS**, em reunião de 11 de março de 2011.

Campo Grande (MS), 11 de março de 2011.


Dr^a Joice Stein
Presidente da CEUA

ANEXO B- Tabela de ajuste de dose do grupo V.

Tabela de ajuste de dose da HNF no grupo V
Dose inicial de 200UI/Kg SC 12/12h

Valor do TTPa	Ação em relação a dose inicial/ anterior ao exame
<1,2x	Aumentar 20% da dosagem para próxima dose
1,2-1,5x	Aumentar 10% da dosagem para próxima dose
1,5-2,5x	Sem alterações
2,5-3x	Reduzir 10% da dosagem para próxima dose
>3x, sem evento hemorrágico	Reduzir 20% da dosagem para próxima dose
>3x, com evento hemorrágico	Suspender a próxima dose e ao reiniciar, reduzir para 20% da dosagem

Adaptado do Nomograma de Raschke (SARDINHA; SILVESTRE, 2006).