



RENATA CASTANHEIRA GUIMARÃES SILVA

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E EXPRESSÃO DO
TRANSPORTADOR DE GLICOSE 1 (GLUT-1) NO
INTESTINO FETAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
INSUFICIÊNCIA PLACENTÁRIA ASSOCIADA AO USO DA
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA
(TENS)**

**LAVRAS - MG
2020**

RENATA CASTANHEIRA GUIMARÃES SILVA

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE
GLICOSE 1 (GLUT-1) NO INTESTINO FETAL EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA PLACENTÁRIA ASSOCIADA AO
USO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Camila Souza de Oliveira Guimarães
Orientadora
Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio
Coorientador

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Renata Castanheira Guimarães.

Análise morfométrica e expressão do transportador de glicose 1 (GLUT-1) no intestino fetal em um modelo experimental de insuficiência placentária associada ao uso da estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) / Renata Castanheira Guimarães Silva. - 2020.

51 p. : il.

Orientador(a): Camila Souza de Oliveira Guimarães.

Coorientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Hipóxia. 2. Neuroestimulação elétrica. 3. Vascular. I. Guimarães, Camila Souza de Oliveira. II. Remedio, Rafael Neodini.

RENATA CASTANHEIRA GUIMARÃES SILVA

ANÁLISE MORFOMÉTRICA E EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE 1 (GLUT-1) NO INTESTINO FETAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA PLACENTÁRIA ASSOCIADA AO USO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS)

MORPHOMETRIC ANALYSIS AND EXPRESSION OF GLUCOSE CARRIER 1 (GLUT-1) IN THE FETAL INTESTINE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PLACENTARY INSUFFICIENCY ASSOCIATED WITH THE USE OF TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL NERVE STIMULATION (TENS)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 13 de janeiro de 2020.
Dra. Giancarla Aparecida Botelho Santos
Dra. Lidiane Orlandi

UFLA
UNILAVRAS

Profa. Dra. Camila Souza de Oliveira Guimarães
Orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

*Ao meu marido Adriano e aos meus filhos Mateus e Henrique, por todo apoio amor e
paciência.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e iluminar, por abrir meus caminhos para tantas oportunidades e realizações em minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Camila Souza de Oliveira Guimarães, pela paciência, doçura e ensinamentos, professora admirável que terei sempre como exemplo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio pela calma e assertividade, sempre com bom humor e competência.

Ao Prof. Dr. Luciano José Pereira pelo apoio desde o início, pelo socorro sempre e pela amizade sincera.

Ao Técnico do Laboratório de Morfologia, Isaac Felipe Moreira Konig por toda ajuda, colaboração e apoio durante a execução do processamento do material utilizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, desde a coordenação às secretárias sempre gentis e atenciosas, agradeço a colaboração e apoio, e aos professores do mesmo agradeço pelos os ensinamentos.

Aos amigos e companheiros de Pós-Graduação, pela troca de experiências e bons momentos de convivência. Em especial: Melissa Goulart, Marcos Siervuli e Fernanda Montanari.

Aos meus pais Renato e Heloisa, por viabilizarem o aproveitamento total desta oportunidade, pelo amor e apoio em todos os momentos.

Aos animais deste experimento.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram minha gratidão.

*Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do
nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos
lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para
sempre, à margem de nós mesmos.*

Fernando Pessoa

RESUMO

A insuficiência placentária é uma complicação importante durante o período gestacional, podendo levar ao comprometimento de diferentes órgãos fetais, inclusive o intestino. A Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS), um recurso terapêutico utilizado na fisioterapia devido aos seus efeitos analgésicos, tem sido associada ao aumento do fluxo sanguíneo em diversos órgãos, mas seus efeitos sobre a perfusão tecidual ainda não estão completamente esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os impactos da restrição de fluxo sanguíneo uterino sobre o intestino fetal e os efeitos da TENS neste contexto. Fêmeas da espécie *Rattus norvegicus albinus* foram submetidas à ligadura da artéria uterina direita no 15º dia de gestação; o corno uterino contralateral foi utilizado como controle. As sessões de TENS foram realizadas uma vez ao dia, com duração de 30 minutos, do pós-operatório imediato até o 19º de gestação quando as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.), e submetidas à eutanásia com cloreto de potássio em dose letal. Os fetos destas matrizes foram incluídos no estudo, conforme a distribuição dos grupos: LE (n=6) – ligadura com estímulo; CE (n=6) – controle com estímulo; LS (n=6) – ligadura sem estímulo e CS (n=6) controle sem estímulo. Após processamento histológico e coloração por hematoxilina e eosina, o intestino fetal foi analisado morfometricamente quanto ao diâmetro das alças intestinais, altura de vilosidades, espessura total da parede intestinal, e espessura da camada muscular e da lâmina própria. Os vasos intestinais identificados na camada serosa foram mensurados quanto ao seu calibre. A expressão do transportador de glicose 1 (GLUT-1) foi avaliada após técnica de imuno-histoquímica. Os resultados revelaram aumento na espessura da lâmina própria e no calibre dos vasos da serosa nos grupos submetidos ao TENS, sugerindo um efeito vasodilatador do estímulo elétrico no intestino fetal.

Palavras-chave: Gestação. Hipóxia. Neuroestimulação elétrica. Morfometria intestinal fetal.

ABSTRACT

Placental insufficiency is an important complication during pregnancy, which can lead to the involvement of different fetal organs, including the intestine. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS), a therapeutic resource used in physiotherapy due to its analgesic effects, has been associated with increased blood flow in several organs, but its effects on tissue perfusion are not yet fully understood. The aim of the present study was to evaluate the impacts of the restriction of uterine blood flow on the fetal intestine and the effects of TENS in this context. Females of the species *Rattus norvegicus albinus* were submitted to ligation of the right uterine artery on the 15th day of pregnancy; the contralateral uterine horn was used as a control. The TENS sessions were performed once a day, lasting 30 minutes, from the immediate postoperative period until the 19th pregnancy when the rats were anesthetized with sodium thiopental (40 mg / kg, ip), and euthanized with lethal potassium chloride. The fetuses of these matrices were included in the study, according to the distribution of the groups: LE (n = 6) - ligation with stimulus; CE (n = 6) - control with stimulus; LS (n = 6) - ligation without stimulus and CS (n = 6) control without stimulus. After histological processing and staining with hematoxylin and eosin, the fetal intestine was morphometrically analyzed for the diameter of the intestinal loops, villus height, total thickness of the intestinal wall, and thickness of the muscle layer and lamina propria. The intestinal vessels identified in the serous layer were measured for their caliber. Glucose transporter 1 (GLUT-1) expression was evaluated after immunohistochemistry. The results revealed an increase in the thickness of the lamina propria and in the caliber of the serous vessels in the groups submitted to TENS, suggesting a vasodilating effect of the electrical stimulus in the fetal intestine.

Keywords: Pregnancy. Hypoxia. Electrical neurostimulation. Fetal intestinal morphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo experimental de insuficiência placentária utilizando a ligadura unilateral da artéria uterina, próximo à terminação cervical do arco arterial. O corno uterino contralateral é considerado como controle.	18
Figura 2 - Suprimento sanguíneo dos órgãos genitais femininos de ratas.	19
Figura 3 – Separação das matrizes por grupo.	27
Figura 4 – Medidas dos diâmetros intestinais.	28
Figura 5 – Medidas da parede intestinal correspondentes à maior vilosidade.	29
Figura 6 – Medida correspondente à área da alça intestinal.	29
Figura 7 – Medida correspondentes ao calibre dos vasos da serosa.	30
Figura 8 – Imagem com área da alça intestinal imunomarcada. Expressão do GLUT-1.	31
Figura 9 – Imagem com área da alça intestinal imunomarcada selecionada no Image J®.	32
Figura 10 – Análise morfométrica intestinal. Comparação entre os grupos LE (ligadura com estímulo), LS (ligadura sem estímulo), CE (controle com estímulo) e CS (controle com estímulo). (A) Área da alça intestinal (μm^2). (B) Espessura total da parede intestinal (μm). (C) Maior diâmetro (μm). (D) Menor diâmetro (μm). (E) Espessura da camada muscular (μm). (F) Espessura da lâmina própria (μm) Diferenças significativas ($p < 0,05$) em casos de distribuição normal foram determinadas pelo teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey. Para os casos de distribuição não-normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.	35
Figura 11 – Análise morfométrica intestinal e expressão do Transportador de Glicose 1 (GLUT-1) no intestino fetal. Comparação entre os grupos LE (ligadura com estímulo), LS (ligadura sem estímulo), CE (controle com estímulo) e CS (controle com estímulo). (G) Altura das vilosidades (μm). (H) Calibre dos vasos da serosa (μm^2). (I) Área imunomarcada GLUT-1 (%). Diferenças significativas ($p < 0,05$) em casos de distribuição normal foram determinadas pelo teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey. Para os casos de distribuição não-normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros morfométricos intestinais comparados entre fetos dos grupos ligadura com estímulo (LE), ligadura sem estímulo (LS), controle com estímulo (CE) e controle sem estímulo (CS). Nos casos de distribuição normal foi utilizado o teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey e os resultados foram expressos em média e desvio padrão ($X \pm DP$). Nos casos de distribuição não-normal utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo teste de Dunn e os resultados foram expressos em mediana, valores mínimo e máximo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). 34

LISTA DE ABREVIATURAS

TENS	estimulação nervosa elétrica transcutânea
RCIU	restrição do crescimento intrauterino
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
LE	ligadura com estímulo
CE	controle com estímulo
LS	ligadura sem estímulo
CS	controle sem estímulo
CEUA	comitê de ética no uso de animais
FV	fator de variação
GL	grau de liberdade
HE	hematoxilina e eosina

LISTA DE SIGLAS

NaCl cloreto de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Crescimento Fetal e Desenvolvimento Intestinal.....	16
2.2 Insuficiência Placentária.....	17
2.3 Modelos Experimentais	17
2.4 Influência da Insuficiência Placentária Sobre o Desenvolvimento Intestinal Fetal.....	19
2.5 Programação Fetal.....	20
2.6 Marcadores de Hipóxia	21
2.7 Estimulação Elétrica Nervosa Elétrica Transcutânea	22
2.8 Uso da TENS Durante a Gestação.....	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos	24
5 MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1. Aspectos Éticos	25
5.2 Animais Experimentais	25
5.3 Indução da Restrição do Fluxo Uteroplacentário.....	26
5.4 Estimulação Elétrica dos Animais	26
5.5 Eutanásia e Coleta dos Fetos	27
5.6 Análise Morfométrica Intestinal	28
5.7 Imuno-histoquímica	30
5.8 Análise Estatística	32
6 RESULTADOS.....	33
7 DISCUSSÃO	37
8 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do organismo fetal é diretamente dependente do suprimento sanguíneo uteroplacentário. A insuficiência placentária é uma das principais causas da restrição do crescimento intrauterino (RCIU), uma intercorrência gestacional grave com complicações a curto e longo prazo e está diretamente relacionada a modificações estruturais e funcionais em diferentes sistemas orgânicos do feto (ZHANG et al., 2015; KONJE et al., 2003), que podem inclusive explicar doenças da idade adulta, enfatizando a teoria de 'programação fetal'.

Neste contexto, as alterações do trato gastrointestinal têm sido associadas à ocorrência de complicações como enterocolite necrosante, intolerâncias alimentares e distúrbios intestinais que se estendem por toda vida.

Foi demonstrado que a aplicação da TENS em pacientes com redução da perfusão útero-placentária provoca um aumento significativo do fluxo sanguíneo, concluindo que a estimulação nervosa elétrica transcutânea pode ser usada com propósito terapêutico nos casos de disfunção placentária (KUBISTA et al., 1980). A TENS é um recurso terapêutico não medicamentoso e de baixo custo, largamente utilizada na fisioterapia devido a seus efeitos analgésicos, porém os efeitos da TENS sobre a circulação ainda são contraditórios. Podem variar de aumento ou diminuição da circulação local ou sistêmica, dependendo da área onde a corrente é aplicada, pois as respostas podem ser diferentes frente aos estímulos e os mecanismos de ação sobre o leito vascular ainda não estão definidos.

Na ocorrência de hipóxia, sabe-se que a GLUT-1 é uma das proteínas que podem ter sua expressão aumentada frente à diminuição do fluxo sanguíneo (COERE et al., 2007), inclusive nos tecidos placentários.

Devido à importância clínica da restrição do fluxo sanguíneo placentário e suas consequências para o organismo fetal, faz-se necessária a investigação do impacto desta condição sobre a morfologia intestinal fetal e a expressão de GLUT-1, bem como os efeitos da utilização da TENS nestes casos

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Crescimento Fetal e Desenvolvimento Intestinal

A origem embrionária do trato intestinal é semelhante em todos os vertebrados. O endoderma dá origem à folha epitelial que alinha o lúmen intestinal enquanto o mesênquima fornece o tecido conjuntivo ou lâmina própria que suporta o epitélio e forma com o último a mucosa e os estratos exteriores, ou seja, a submucosa, o tecido muscular formado de dois estratos musculares e a serosa (VIEIRA-LOPES et al., 2014).

Entre a fecundação até o final do primeiro trimestre de gestação ocorrem as principais transformações embriológicas, fase chamada de organogênese, ou seja, a evolução de um embrião para um organismo complexo onde o feto desenvolve a maioria dos órgãos do sistema nervoso, abdome, sistema esquelético, sistemas circulatório e gastrointestinal e um sistema respiratório ainda rudimentar. O desenvolvimento fetal normal depende de diversos fatores maternos, fetais, placentários, bem como de fatores externos combinados com o potencial de crescimento fetal. Os impactos multissistema específicos das disfunções placentárias podem produzir um aumento nas taxas de mortalidade e morbidade (BASCHAT et al., 2000; BERNSTEIN et al., 2000; GARDOSI et al., 1992).

Quando o tubo intestinal primitivo murino é formado, no 9º dia embrionário, este possui um lúmen central cercado por um epitélio polarizado derivado da endoderme. No 14º dia, o epitélio espessado inicia um processo drástico de remodelação pelo qual a superfície luminal anteriormente plana é convertida em vilosidades, que são projeções epiteliais com núcleos mesenquimais (GROSSE et al., 2011; WELLS; MELTON, 1999; ZORN; WELLS, 2009).

Os mecanismos que impulsionam o crescimento da circunferência intestinal são previamente diferenciados em epitélios estratificados e pseudoestratificados. Os epitélios estratificados aumentam o perímetro intestinal adicionando camadas de células, enquanto epitélio pseudoestratificado é engrossado pelo alongamento progressivo de células epiteliais (GROSSE et al., 2011).

O intestino maduro é um órgão altamente complexo com várias funções essenciais. Além de absorver nutrientes, o intestino tem importantes funções no sistema imune. O interior do intestino tem uma camada epitelial que serve como barreira para o ambiente externo protegendo o corpo contra micróbios e patógenos internos (comensais)

(CHIN et al., 2017). É necessária uma compreensão integrada e abrangente do crescimento, desenvolvimento e maturação do intestino devido a sua função dinâmica ao longo da vida.

2.2 Insuficiência Placentária

Em mamíferos eutérios, também conhecidos como placentários, a placenta é a principal interface entre o feto e a mãe. Uma das principais funções da placenta é fornecer nutrientes e oxigênio ao feto. A falha da placenta em fornecer um suprimento adequado de nutrientes é denominada insuficiência placentária, condição que resulta em restrição de crescimento intrauterino (RCIU), afetando entre 5% a 10% das gestações (ZHANG et al., 2015; KONJE et al., 2003).

O nascimento com peso abaixo do percentil 10 é o que caracteriza clinicamente a RCIU, ou seja, o feto não atinge seu potencial de crescimento. Há uma associação considerável entre este tipo de complicação gestacional e a mortalidade perinatal, além de morbidades a longo prazo. A morbimortalidade elevada nos recém-nascidos com RCIU é associada a alterações metabólicas, asfixia, síndrome do desconforto respiratório, hemorragia intracraniana, aspiração meconial e hipotermia, entre outros (LIN e EVANS, 1984), e as repercussões tardias incluem alterações no desenvolvimento físico, neuro-psicomotor e intelectual, risco de hipertensão arterial, triglicérides séricos elevados, alterações endócrinas e subfertilidade (CICOGNANI et al., 2002). Os recém-nascidos com RCIU têm um risco maior de encefalopatia hipóxico-isquêmica, hemorragia intraventricular e enterocolite necrosante, com maior tempo de internação e maiores custos de assistência médica (MORRISON, 2008; MCMILLEN; ROBINSON, 2005).

Fatores maternos, placentários e fetais diferenciam a etiologia da RCIU. Apesar de muitos estudos lidarem com diferentes aspectos da RCIU em gestações humanas, os processos fisiopatológicos subjacentes a esta complicação são complexos e não estão ainda totalmente compreendidos. Diferentes modelos animais tem sido utilizados para esclarecer os processos de regulação do crescimento fetal no desenvolvimento normal e na RCIU (ERGAZ et al., 2005).

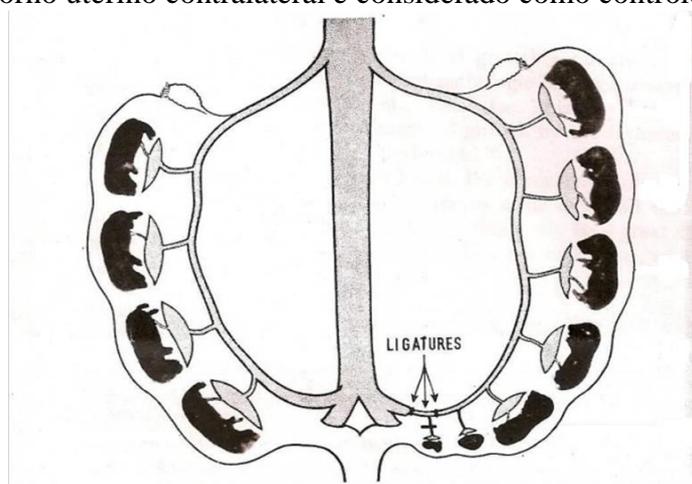
2.3 Modelos Experimentais

Há uma série de intervenções maternas capazes de criar restrição do crescimento fetal em animais experimentais. (SWANSON; DAVID, 2015). Vários modelos de RCIU vêm sendo propostos para facilitar a compreensão da fisiopatologia da doença. O modelo que utiliza ratos é o mais empregado, pois além de ter alta semelhança bioquímica e fisiológica com a biologia humana, traz as vantagens do curto período de gestação, baixo custo e fácil manipulação (BUENO et al., 2010).

Como exemplos de modelos experimentais que têm sido utilizados para a indução da RCIU na prole, cita-se a restrição materna de calorias (THAMOTHARAN, 2004) e de proteínas (JANSSON et al., 2006), hipertermia materna (BARRY et al., 2006), tabagismo materno passivo, (BASSI et al., 1984), administração de álcool à mãe (CHEN; GRÉGOIRE NYOMBA, 2003) e hipóxia fetal a partir de ligadura da artéria uterina (VUGUIN et al., 2004).

A indução da restrição do crescimento em fetos de ratos por meio da ligadura da artéria uterina demonstra a importância do suprimento sanguíneo uterino como um fator de controle no crescimento fetal (J. S. WIGGLESWORTH, 1974). Neste modelo, ratas prenhas foram submetidas à ligadura unilateral da artéria uterina próximo à terminação cervical do arco arterial, e o corno contralateral, não ligado, é utilizado como controle. Como resultado, no corno ligado, vários fetos apresentaram restrição do crescimento e alguns fetos foram reabsorvidos. Além da redução global no tamanho corporal dos fetos, a variação nos pesos dos órgãos é semelhante àquela encontrada em humanos (J. S. WIGGLESWORTH, 1974).

Figura 1 – Modelo experimental de insuficiência placentária utilizando a ligadura unilateral da artéria uterina, próximo à terminação cervical do arco arterial. O corno uterino contralateral é considerado como controle.



Fonte: Wigglesworth (1974).

desenvolvimento ileal, diminuindo o número de células de Paneth, afetando particularmente a composição dos produtos secretados na superfície epitelial do intestino (YANAI et al., 2017).

2.5 Programação Fetal

O uso de modelos animais para determinar os eventos moleculares, genéticos ou celulares melhora a compreensão da relação entre nutrição fetal na RCIU e as doenças na idade adulta. A capacidade do feto de se adaptar à restrição de nutrientes regula todo o metabolismo, e essa nova situação pode ser responsável por algumas doenças na vida adulta (FUNG et al., 2016; BUENO et al., 2010).

O termo "programação fetal" refere-se à teoria recente “doença da vida adulta com origens fetais” neste caso restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) aumentando a mortalidade do feto e do recém-nascido durante período perinatal e inibindo o crescimento normal após o nascimento afetando o indivíduo por toda a vida. Comparando-se leitões normais com leitões que apresentaram RCIU, estes têm em seu sistema gastrointestinal órgãos menores e disfunções diversas (WANG et al., 2005).

Bebês com RCIU tem um risco consideravelmente maior de desenvolver enterocolite necrosante, especialmente se houver detecção pré-natal de diminuição do fluxo arterial uterino. A enterocolite necrosante é uma síndrome de necrose intestinal aguda de etiologia desconhecida afetando cerca de 5% de todos os bebês prematuros ou com muito baixo peso ao nascer (MCGUIRE, 2015).

Com base nessas informações sabe-se que a insuficiência uteroplacentária é uma das principais causas de RCIU, e que esta condição pode levar a alterações ainda pouco esclarecidas no trato gastrointestinal fetal que podem refletir em toda a vida do indivíduo.

Tanto o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) via cortisol quanto o sistema nervoso adrenomedular / simpático via catecolaminas servem como reguladores homeostáticos em resposta a estresse crônico. Nos fetos mamíferos maiores, esses sistemas exibem maturação no final da gestação e desempenham papéis semelhantes, fornecendo ao feto os meios para responder a fatores estressores intrauterinos. A ativação desses dois mecanismos leva a rápidas alterações glicêmicas, renais e cardiovasculares bem como modificações adaptativas mais lentas da expressão gênica para combater potenciais efeitos a longo prazo. Embora essas respostas ao estresse hipóxico possam muitas vezes ser benéficas de forma aguda, elas têm o potencial de ser deletérias,

especialmente em períodos prolongados de estresse hipóxico (NEWBY; MYERS; DUCSAY, 2015).

Esses processos complexos são integrados para produzir alterações funcionalmente importantes da morfologia e função intestinal durante a vida intra-uterina e pós-natal precoce, preparar o recém nascido para a alimentação precoce de leite com alto teor de gordura e, em seguida, alimentos sólidos contendo carboidratos. Assim, a ontogenia, crescimento inicial e desenvolvimento do intestino, são importantes ramos a serem estudado devido ao potencial destes eventos iniciais da vida afetarem a capacidade de resposta do intestino a desafios fisiológicos ou patológicos mais tarde na vida adulta (DROZDOWSKI; LANDININ; THOMSON, 2010).

2.6 Marcadores de Hipóxia

A glicose é o principal combustível para o metabolismo fetal, e seu suprimento é importante para avaliar o crescimento do feto. Seu transporte ocorre por difusão, a partir do gradiente de concentração materno-fetal, facilitado pelos transportadores de glicose (GLUTs), uma família de proteínas de membrana estruturalmente semelhantes (ZHOU e BONDY, 1993). A insuficiência uteroplacentária envolve um ambiente intrauterino alterado, caracterizado por hipóxia, diminuição da disponibilidade de fatores de crescimento e hipoglicemia (ERGAZ et al., 2005). Alterações no fluxo sanguíneo, como a redução do fluxo uteroplacentário frequentemente observada na RCIU, alteram a oferta de glicose, e conseqüentemente o gradiente de concentração de glicose materno-fetal, resultando em uma taxa alterada de transferência de glicose para o feto (ILLSLEY et al., 1987). A transferência de glicose também é afetada pelo estado metabólico da placenta. As alterações na oferta de outros substratos geradores de energia, tais como a redução da oferta de oxigênio na hipóxia, vão produzir mudanças na demanda metabólica placentária para a glicose, levando a alterações na transferência materno-fetal (VARDHANA e ILLSLEY, 2002). A GLUT-1 é uma das proteínas que podem ter expressão aumentada em condições de hipóxia, em que há maior transcrição do gene GLUT-1, mediada pelo Fator Induzível pela Hipóxia alfa (HIF-1a) (COERE et al., 2007).

A expressão de GLUT-1 está aumentada na membrana plasmática basal das células placentárias na presença de diabetes gestacional predispondo os recém-nascidos à macrosomia, em contrapartida a restrição do crescimento fetal associada à hipóxia placentária mostrou uma expressão reduzida de GLUT-1 na membrana plasmática basal.

Por outro lado, sua expressão não foi alterada na restrição idiopática do crescimento fetal devido ao fato de que as diferentes etiologias da RCIU podem ocorrer por mecanismos patogênicos distintos que podem alterar ou não a expressão do GLUT-1.(CHANDRASIRI et al., 2013)

2.7 Estimulação Elétrica Nervosa Elétrica Transcutânea

Correntes elétricas terapêuticas são uma das várias modalidades usadas na fisioterapia. Uma vez ajustados aos parâmetros apropriados, essas correntes podem agir de diferentes maneiras, promovendo analgesia e contrações musculares, melhorando a circulação muscular, bem como favorecendo a reparação e cicatrização tecidual (LIEBANO et al., 2003). Como TENS é uma forma muito econômica e eficaz de terapia da dor, muitos especialistas acreditam que este método deve ser avaliado como método de tratamento adjuvante nos quadros álgicos, oferecendo ao paciente um benefício individualizado para sua condição (QUITTAN et al., 2016)

O efeito da Estimulação Nervosa Elétrica Transcutânea é explicado por dois mecanismos. O primeiro é a teoria do portão de controle que é baseada na estimulação de fibras nervosas A β , que inibe os impulsos nociceptivos dos cornos posteriores da medula espinhal e ativa sistemas descendentes antinociceptivos. Existe um bloqueio do impulso nervoso que carrega as informações sobre a dor, então o corpo não tem dados sobre sua localização e severidade. O segundo mecanismo de ação explica o efeito analgésico da TENS na secreção de hormônios. A estimulação causa a liberação de opioides endógenos no cérebro através dos pulsos de baixa frequência (WAWRYKÓW; KORABIUSZ, 2018).

Além de seus efeitos analgésicos, relata-se também que a TENS provoca modificação da temperatura da pele e melhora do fluxo sanguíneo, observação que levou ao estudo do seu impacto sobre a vascularização periférica. Foi observado um aumento da angiogênese e modificação do fluxo sanguíneo local, diminuindo a necrose de enxertos de pele, ativando as fibras nervosas e modificando a resistência vascular. (AJEENA et al., 2018; MACHADO et al., 2017; ATALAY; YILMAZ, 2009). O aumento na temperatura da pele também foi associado a analgesia quando a TENS foi utilizada em pacientes que apresentavam dor nas extremidades dos membros. O alívio da dor foi observado quando houve este aumento de temperatura, enquanto a dor persistiu em indivíduos cuja temperatura da pele não mudou. O efeito analgésico foi possivelmente o

resultado da redução da atividade simpática, que induz vasodilatação e alivia a dor (ABRAM; ASIDDAO; REYNOLDS, 1980).

2.8 Uso da TENS Durante a Gestação

Episódios de lombalgia e dor pélvica durante a gestação são relativamente comuns. Há uma busca constante por procedimentos não farmacológicos que possam ser usados para o controle da dor durante a gravidez, sem oferecer risco para a mãe ou feto (YOKOYAMA et al., 2015). Frente à baixa disponibilidade de recursos analgésicos que possam ser utilizados com segurança durante o período gestacional, a TENS pode ser uma opção terapêutica, respeitando-se algumas contra-indicações, como por exemplo, evitar a fixação dos eletrodos diretamente sobre o abdomen e não utilizar a eletroestimulação no início da gestação, pois seus efeitos sobre o feto ainda não estão totalmente esclarecidos e acredita-se que neste período a TENS pode induzir contrações uterinas, aumentando o risco de aborto (TEOLI; AN, 2018; BEDWELL, 2011; JONES; JOHNSON, 2009).

Em obstetria, a Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea para alívio da dor durante o trabalho de parto em mulheres com mais de 37 semanas, foi utilizada pela primeira vez em 1970 na Escandinávia (WAWRYKÓW; KORABIUSZ, 2018). Em humanos, estudos demonstraram que a aplicação da TENS em pacientes com redução da perfusão uteroplacentária provoca aumento significativo do fluxo sanguíneo, mensurado a partir de radioisótopos, concluindo que a TENS pode ser usada com propósito terapêutico nos casos de disfunção placentária (KUBISTA, E.; PHILIPP, 1979). Em ratas com restrição do fluxo sanguíneo uterino, entretanto, o uso de TENS foi associado à redução do número, calibre e área de vasos sanguíneos placentários; menor peso e comprimento fetal; e redução do volume da placenta (GUIMARÃES et al., 2013).

Reforçando estes achados, demonstrou-se que a TENS potencializa os efeitos negativos da restrição de fluxo sanguíneo uterino sobre parâmetros fetais como as distâncias fronto-occipital, torácica ventral-dorsal e abdominal ventral-dorsal, além de estar associada ao aumento da expressão de transportador de glicose (GLUT-1) no cérebro fetal (GUIMARÃES et al., 2016). Por outro lado, em ratas sem insuficiência placentária, não foram demonstradas alterações quanto ao número de fetos ou alterações placentárias em associação ao uso da TENS (YOKOYAMA et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da restrição de fluxo sanguíneo uterino associada ao uso da TENS sobre parâmetros morfométricos e expressão de GLUT-1 no intestino fetal.

3.2 Objetivos Específicos

- 1 Analisar morfometricamente: o diâmetro da luz intestinal fetal, altura das vilosidades intestinais, espessura da lâmina própria, camada muscular, espessura total da parede intestinal e calibre dos vasos sanguíneos presentes na serosa.
- 2 Quantificar a expressão de GLUT-1 no intestino fetal.
- 3 Compreender os efeitos da restrição de fluxo sanguíneo uterino e da TENS sobre os parâmetros supracitados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, e aprovado sob protocolo número 35/2006 (Anexo 1). Todos os procedimentos experimentais empregados neste projeto estiveram de acordo com o CONCEA.

5.2 Animais Experimentais

Para execução do modelo experimental, seis fêmeas *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, foram mantidas em gaiolas, com ciclo luz-escuro de 12 h/12 h, luzes acesas às 7:00 h, água e alimentação padrão à vontade.

A estimativa do ciclo estral foi feita segundo critérios estabelecidos na literatura (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). O método consiste na coleta de fluido vaginal, que foi realizada entre 9:00 e 10:00 horas da manhã, com uso de uma pipeta plástica preenchida por 10 µL de solução salina (NaCl a 0,9 %), inserida na vagina da rata, de maneira não muito profunda. O esfregaço vaginal coletado foi então depositado em lâmina de vidro, sem lamínula, e observado ao microscópio de luz, com objetivas de 10 a 40 vezes. Foram reconhecidos três tipos celulares: células epiteliais (redondas e nucleadas), células cornificadas (irregulares e anucleadas) e leucócitos. A proporção entre esses três tipos celulares foi utilizada na determinação do ciclo estral, sendo dividida em quatro fases: Proestro, com predomínio de células epiteliais; Estro, com predomínio de células cornificadas; Metaestro, onde há igual proporção entre leucócitos, células cornificadas e epiteliais; e Diestro, onde há predomínio de leucócitos. A média de duração do ciclo é de 4 a 5 dias, geralmente seguindo as fases de proestro, estro, metaestro e diestro.

A ovulação ocorre entre o início da fase Proestro até o final da fase Estro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Determinada a fase Proestro, a fêmea foi mantida na mesma gaiola com um rato macho, durante 24 horas, para o acasalamento. Após 24 horas foi feita uma nova análise do fluido vaginal, para pesquisa de espermatozoides, que quando encontrados indicavam que houve acasalamento. Foram

feitas análises do fluido vaginal em todos os dias subsequentes para verificar a manutenção da fase Diestro (Diestro gestacional), o que confirmava a gestação. Mantida esta fase, o dia em que foram observados espermatozoides no fluido vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação.

5.3 Indução da Restrição do Fluxo Uteroplacentário

No 15º dia de gestação, todas as ratas prenhas foram submetidas à cirurgia de ligadura da artéria uterina direita, para indução da insuficiência uteroplacentária e restrição do crescimento fetal, como descrito na literatura (WIGGLESWORTH, 1964). Como anestésico foi utilizado tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.). Foi feita uma incisão mediana abdominal xifo-púbica, o número de sítios de implantação em cada corno uterino foi avaliado, e então foi feita a ligadura da artéria uterina direita, por meio de um nó simples com fio nylon monofilamentar 5-0, assegurando que o único suprimento sanguíneo restante era o da artéria ovariana. O corno uterino não-ligado serviu como controle. A síntese da parede abdominal foi feita em dois planos de sutura, sendo que no plano peritônio-músculo aponeurótico, foram realizados pontos separados, equidistantes dois milímetros entre si, utilizando fio nylon monofilamentar 4-0. A pele foi suturada com o mesmo fio, em pontos separados, equidistantes cinco milímetros entre si. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições de assepsia.

Após a cirurgia as ratas foram colocadas em gaiolas individuais com aquecimento de fonte luminosa. Para analgesia pós-operatória foi utilizado paracetamol na dose de 200 mg/kg, diluído na água do bebedouro, que permanecia até a eutanásia (PAULO et al., 2007).

5.4 Estimulação Elétrica dos Animais

A TENS foi realizada do pós-operatório imediato até o dia da eutanásia em três das seis ratas prenhas. Foi utilizado um aparelho de eletroestimulação digital com um cabo ligado a dois eletrodos de silicone, acoplados à região lombar, previamente tricotomizada, com gel e fixados com fita adesiva. A intensidade utilizada variou entre 4 e 6 mA respeitando o limite de fibrilação muscular, frequência de 80 Hz e duração de pulso de 200 μ s, seguindo critérios estabelecidos na literatura de TENS de alta frequência

(LIEBANO et al., 2003). As sessões de eletroestimulação foram realizadas uma vez ao dia e cada sessão teve duração de 30 minutos.

5.5 Eutanásia e Coleta dos Fetos

. Foi realizada a cirurgia para retirada dos fetos. Todos os fetos foram medidos, pesados e fixados em formaldeído. Em seguida colocados em cassete histológico e enviados para preparação anatomopatológica. O material emblocado em parafina foi encaminhado para corte em micrótomo com espessura de 4 μ m para a confecção das lâminas. Foram selecionados 24 fetos, divididos nos seguintes grupos conforme a Figura 3:

- 1º Grupo (n=6): fetos do corno uterino direito (com a ligadura da artéria uterina) de ratas submetidas à TENS (ligadura com estímulo – LE).
- 2º Grupo (n=6): fetos do corno uterino esquerdo (controle) de ratas submetidas à TENS (controle com estímulo – CE).
- 3º Grupo (n=6): fetos do corno uterino direito (com a ligadura da artéria uterina) de ratas não submetidas à TENS (ligadura sem estímulo – LS).
- 4º Grupo (n=6): fetos do corno uterino esquerdo (controle) de ratas não submetidas à TENS (controle sem estímulo – CS).

Figura 3 – Separação das matrizes por grupo.



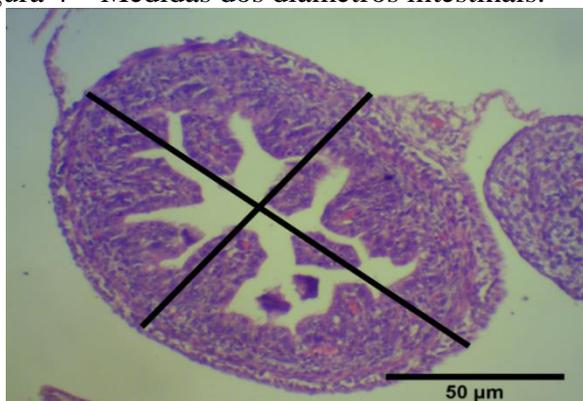
Fonte: Do autor (2019).

5.6 Análise Morfométrica Intestinal

De cada feto, foram realizados 20 cortes seriados, de forma que se teve acesso a porções do intestino em diferentes níveis. A cada dez cortes, um foi corado pela Hematoxilina & Eosina e analisado morfometricamente, totalizando 20 cortes por feto.

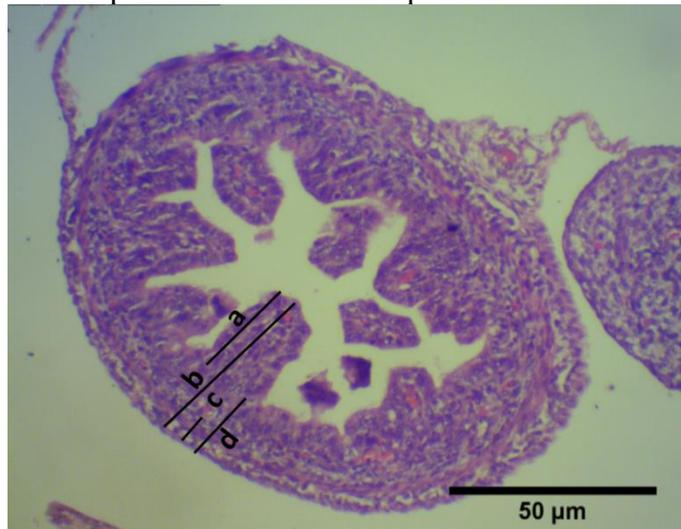
Para a análise morfométrica, os cortes histológicos intestinais transversais foram fotografados utilizando uma câmera (Dino Lite) acoplada ao microscópio com aumento na objetiva de 10 (400 μ m) e pelo software Dino Capture 2.0. Foram analisados os diâmetros intestinais maior e menor (Figura 4) através da medida externa desde a serosa sendo uma medida perpendicular à outra. Em cada corte foram identificadas a maior e a menor vilosidade e, em seguida, foram medidos os seguintes comprimentos e realizada uma média dos mesmos (Figura 5) em cada uma dessas vilosidades: a) Altura da Vilosidade, correspondente à distância entre o ápice e a base das vilosidades, b) Espessura Total, correspondente à distância entre o ápice das vilosidades e a camada serosa, c) Espessura da Camada Muscular, correspondente à distância entre o início da camada circular interna e o fim da camada longitudinal externa e d) Espessura da Lâmina própria, correspondente à distância entre a base das vilosidades e o início da muscular. As áreas das alças foram calculadas de acordo com a delimitação da serosa como pode ser observado na Figura 6. O calibre dos vasos (Figura 7), foi medido através da delimitação dos vasos observados na camada serosa. As medidas foram feitas pela análise de um único observador utilizando o software Image J[®]. Para cada medida intestinal, foi considerada a média dos valores encontrados nos 20 cortes analisados.

Figura 4 – Medidas dos diâmetros intestinais.



Legenda: Medidas do menor diâmetro e maior diâmetro. Coloração HE.
Fonte: Do autor (2019).

Figura 5 – Medidas da parede intestinal correspondentes à maior vilosidade.



Legenda: Altura da vilosidade (a), Espessura Total (b), Espessura da camada muscular (c) e Espessura da lâmina própria (d). Coloração HE.

Fonte: Do autor (2019).

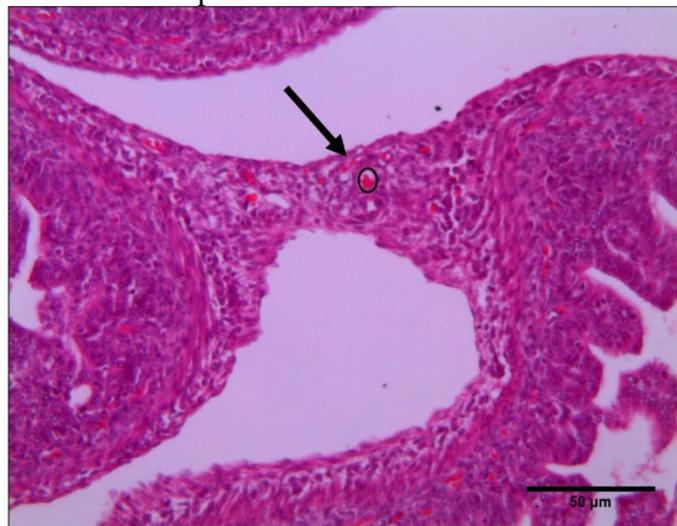
Figura 6 – Medida correspondente à área da alça intestinal.



Legenda: Alça intestinal delimitada. Coloração HE.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 7 – Medida correspondentes ao calibre dos vasos da serosa.



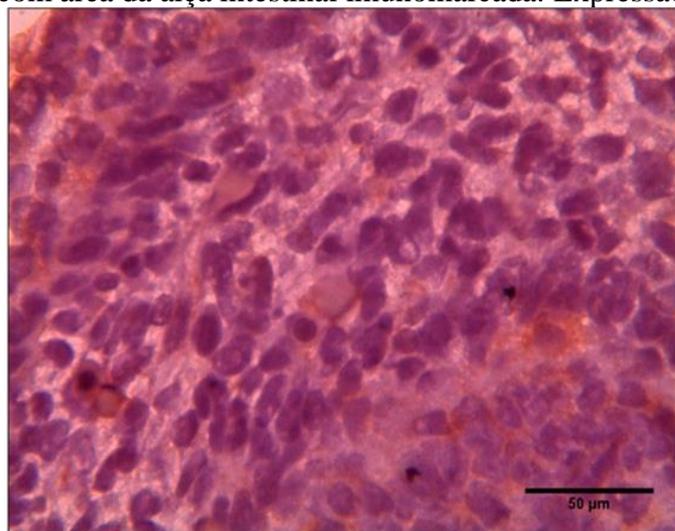
Legenda: Delimitação de vaso da serosa. Coloração HE.
 Fonte: Do autor (2019).

5.7 Imuno-histoquímica

Para a análise da expressão de GLUT-1 no intestino fetal foi realizada a técnica de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo Rabbit polyclonal to Glucose Transporter GLUT-1 (Abcam®). Os cortes de 4 a 5 μm foram fixados nas lâminas com Poli-L Lisina®, posteriormente desparafinizados em xilol, hidratados em álcoois em concentrações decrescentes até água destilada. No processo de recuperação antigênica foi utilizado tampão citrato. Os fragmentos embebidos e tampão citrato permaneceram por vinte minutos em estufa a 97° e depois foram resfriados em temperatura ambiente pelo mesmo período. Foram realizados banhos com tampão PBS 0,05M + Triton® X-100 0,05%. A inibição da peroxidase endógena foi feita com H_2O_2 3%, em tampão PBS + Triton X-100 0,05%, à temperatura ambiente, e no escuro, por 1 hora e 30 minutos. A inibição de radicais aldeído foi feita com glicina 0,1-0,2M em tampão PBS, à temperatura ambiente, por 60 minutos. Para cada 1ml da solução de glicina foram utilizados 5ml de PBS + Triton X-100 0,05%. Posteriormente foi feita a incubação com solução de BSA 2% + (PBS + Triton X-100 0,05%) por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo primário em solução de BSA 1% + (PBS + Triton X-100 0,05%) à temperatura ambiente, com tempo de incubação de duas horas e diluição 1:250. A incubação com o anticorpo secundário LSAB + System-HRP Dako ® foi feita

à temperatura ambiente, com tempo de incubação de duas horas. O material foi então incubado com o complexo Streptavidina-Biotina (LSAB + System-HRP Dako®), por trinta minutos, à temperatura ambiente e posteriormente foi feita a incubação com substrato da peroxidase (DAB), à temperatura ambiente (50 ml de tampão – 15 mg de DAB + 100ml de tampão +30 µl de H₂O₂ por 5 minutos, seguida pela lavagem do material com água destilada para inativar a diaminobenzidina e em seguida em tampão PBS + Triton X-100 0,05%, por 3X, 5 min cada. O material foi então deixado em recipiente com hematoxilina por 5 segundos, desidratado, diafanizado e montado em meio sintético. Para a avaliação da expressão de GLUT-1, as lâminas imunomarcadas foram analisadas ao microscópico de luz comum com câmera acoplada (Leica®), e as áreas destacadas em marrom (Figura 8) devido à precipitação do substrato cromógeno (DAB) foram quantificadas em porcentagem por lâmina utilizando-se o software Image J (Figura 9).

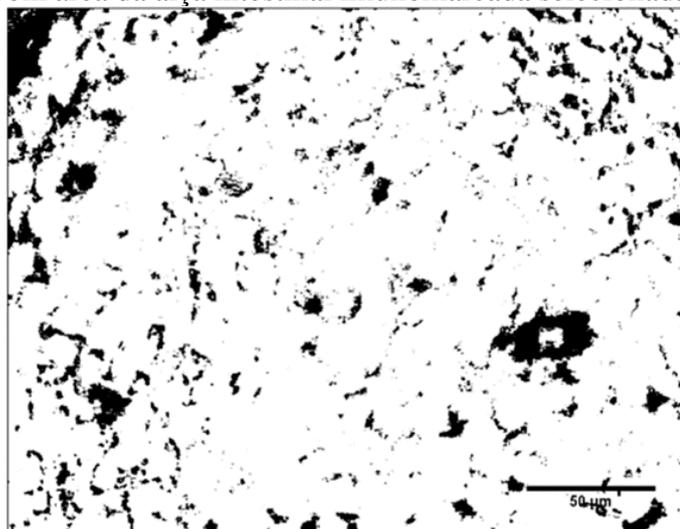
Figura 8 – Imagem com área da alça intestinal imunomarcada. Expressão do GLUT-1.



Legenda: Imagem ao microscópio com áreas imunomarcadas destacadas em marrom. Cromógeno DAB.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 9 – Imagem com área da alça intestinal imunomarcada selecionada no Image J®.



Legenda: Imagem tratada no programa para análise.

Fonte: Do autor (2019).

5.8 Análise Estatística

Para a análise estatística, foram elaboradas planilhas eletrônicas no Microsoft Excell® e as informações foram analisadas utilizando-se o programa eletrônico GraphPadPrism®. Para análise dos efeitos da interação entre a ligadura e o estímulo entre os grupos, nos casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey quando necessário. Neste tipo de distribuição, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ($X \pm DP$). Quando a distribuição não foi normal, ou quando ela foi normal, mas com variâncias não semelhantes, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo teste de Dunn quando necessário. Neste tipo de distribuição os resultados foram expressos em mediana e valores mínimo e máximo (Med-Min-Max). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

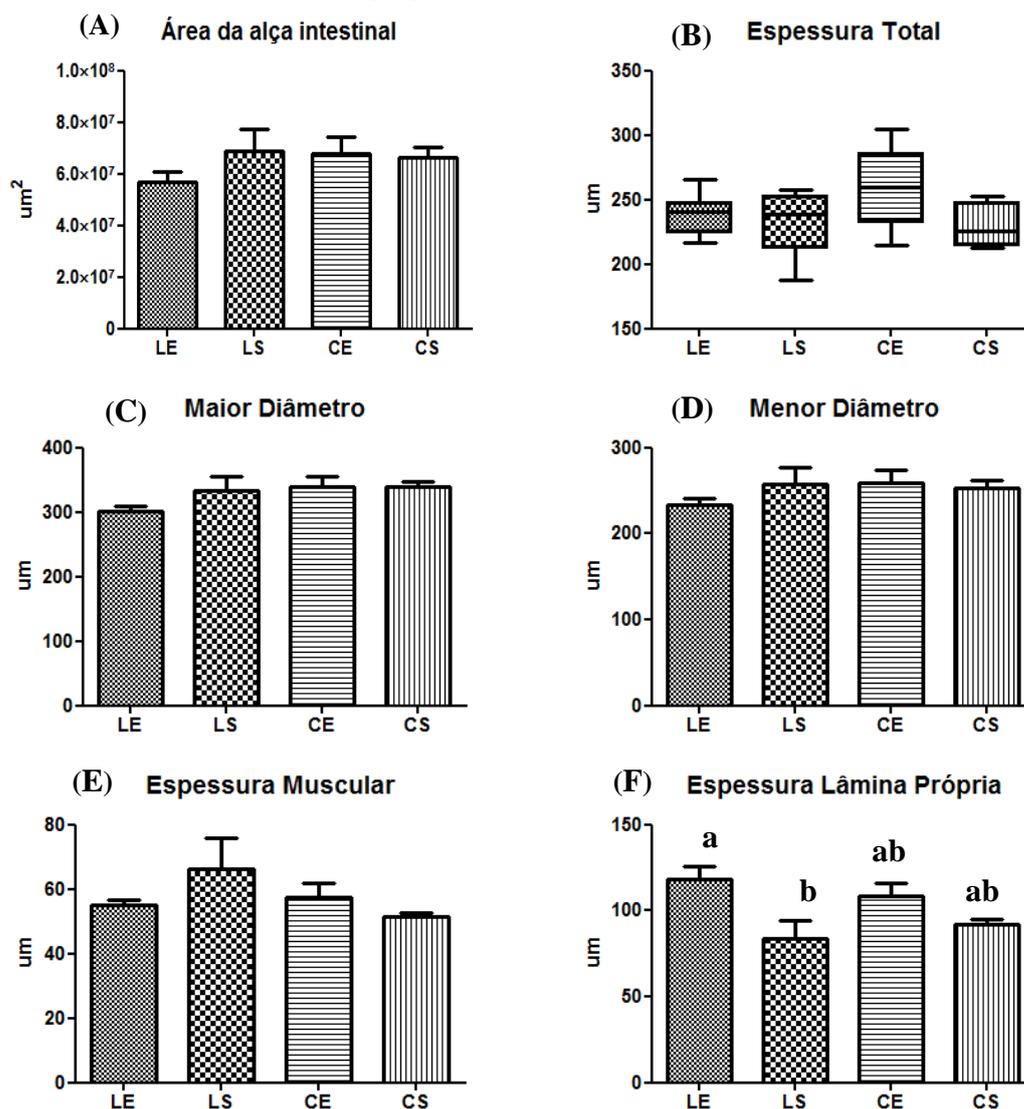
Os fetos do corno uterino com ligadura e submetidos aos efeitos da TENS (grupo LE) apresentaram espessura da lâmina própria significativamente maior ($p = 0,0336$) quando comparados aos fetos do corno uterino com ligadura, mas não submetidos à TENS (grupo LS) (Tabela 1 e Figura 10 e 11). O calibre dos vasos na camada serosa foi significativamente maior ($p = 0,0110$) no intestino dos fetos do grupo controle com estímulo (CE) comparado aos grupos ligadura sem estímulo (LS) e ligadura com estímulo (LE) (Tabela 1 e Figura 10 e 11). Não houve influência significativa da restrição do fluxo sanguíneo uterino ou da TENS sobre a expressão de GLUT-1 (Tabela 1 e Figura 9 e 10). Quanto aos demais parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1 – Parâmetros morfométricos intestinais comparados entre fetos dos grupos ligadura com estímulo (LE), ligadura sem estímulo (LS), controle com estímulo (CE) e controle sem estímulo (CS). Nos casos de distribuição normal foi utilizado o teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey e os resultados foram expressos em média e desvio padrão ($X \pm DP$). Nos casos de distribuição não-normal utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido pelo teste de Dunn e os resultados foram expressos em mediana, valores mínimo e máximo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Parâmetros	LE (n=6)	LS (n=6)	CE (n=6)	CS (n=6)	Valor de p
<i>X ± DP</i>					
Área da alça intestinal	5,683 x 10 ⁷ (± 9,331 x 10 ⁶)	6,892 x 10 ⁷ (± 2,007 x 10 ⁷)	6,774 x 10 ⁷ (± 1,582 x 10 ⁷)	6,652 x 10 ⁷ (± 9,358 x 10 ⁶)	0,4179
Maior diâmetro	300,3 (± 21,78)	334,2 (± 51,41)	339,9 (± 37,80)	339,3 (± 19,07)	0,1850
Menor diâmetro	233,3 (± 18,76)	257,2 (± 48,27)	258,5 (± 36,24)	253,2 (± 21,12)	0,3738
Espessura muscular	55,05 (± 3,90)	66,19 (± 21,96)	57,28 (± 10,57)	51,29 (± 2,89)	0,3336
Espessura lâmina própria	118,0 (± 18,92) a	83,47 (± 24,58) b	108,3 (± 17,55) ab	91,95 (± 5,74) ab	0,0336
Altura da vilosidade	65,95 (± 15,11)	90,22 (± 14,84)	94,09 (± 34,69)	88,80 (± 13,95)	0,1584
Calibre dos vasos da serosa	75180 (± 26931) a	40115 (± 19142) a	282902 (± 227388) b	106227 (± 72027) ab	0,0110
<i>Med (min – max)</i>					
Espessura Total	240,3 (216,9 – 265,2)	238,8 (187,5 – 257,6)	259,7 (214,9 – 304,7)	226,1 (212,8 – 252,4)	0,2813
GLUT-1	6,185 (2,29 – 12,30)	4,27 (2,11 – 41,49)	3,70 (1,97 – 18,71)	4,87 (2,10 – 12,57)	0,6117

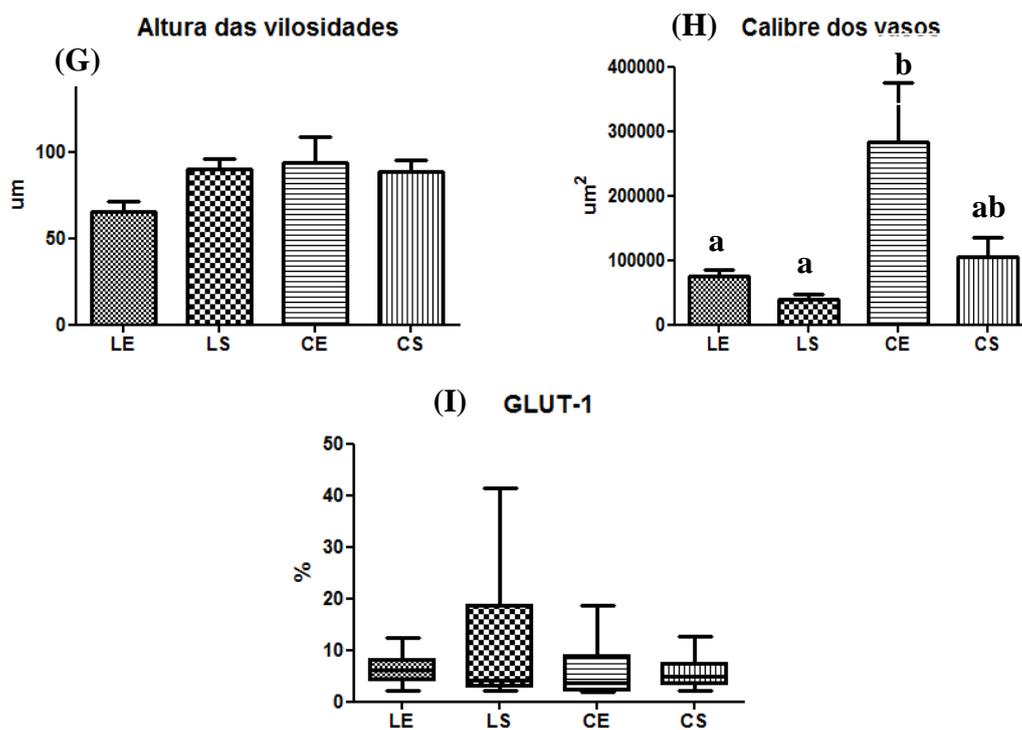
Fonte: Do autor (2019).

Figura 10 – Análise morfométrica intestinal. Comparação entre os grupos LE (ligadura com estímulo), LS (ligadura sem estímulo), CE (controle com estímulo) e CS (controle com estímulo). (A) Área da alça intestinal (μm^2). (B) Espessura total da parede intestinal (μm). (C) Maior diâmetro (μm). (D) Menor diâmetro (μm). (E) Espessura da camada muscular (μm). (F) Espessura da lâmina própria (μm) Diferenças significativas ($p < 0,05$) em casos de distribuição normal foram determinadas pelo teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey. Para os casos de distribuição não-normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 11 – Análise morfométrica intestinal e expressão do Transportador de Glicose 1 (GLUT-1) no intestino fetal. Comparação entre os grupos LE (ligadura com estímulo), LS (ligadura sem estímulo), CE (controle com estímulo) e CS (controle com estímulo). (G) Altura das vilosidades (μm). (H) Calibre dos vasos da serosa (μm^2). (I) Área imunomarcada GLUT-1 (%). Diferenças significativas ($p < 0,05$) em casos de distribuição normal foram determinadas pelo teste One Way ANOVA (F) seguido do teste de Tukey. Para os casos de distribuição não-normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.



Fonte: Do autor (2019).

7 DISCUSSÃO

A insuficiência placentária é uma importante complicação durante o período gestacional, associada a altas taxas de morbimortalidade a curto e longo prazo. Os impactos da insuficiência placentária sobre o desenvolvimento fetal são amplamente discutidos na literatura. O primeiro deles é a RCIU, levando a alteração de peso e tamanho dos fetos, bem como o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta, alterações na morfologia intestinal, dentre outras complicações (BUENO et al., 2010; FUNG et al., 2016; JANSSON et al., 2006; VUGUIN et al., 2004; WIGGLESWORTH, 1974; BASERGA et al., 2004).

No presente estudo foi avaliada a morfologia intestinal fetal em um modelo experimental de insuficiência placentária e sua interação com o uso da TENS. Os resultados indicaram que nos fetos com restrição do fluxo sanguíneo uterino (corno uterino com ligadura), o uso da TENS esteve associado ao aumento da espessura da lâmina própria e aumento do calibre dos vasos da serosa. Sabe-se que na base do epitélio intestinal encontra-se a lâmina própria bem vascularizada e constituída por tecido conjuntivo e que externamente, o intestino é envolvido pela serosa, constituída de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (VIEIRA-LOPES et al., 2014), sugerindo assim que a aplicação da TENS provocou um aumento da lâmina própria como consequência da vasodilatação dos vasos sanguíneos da serosa.

Em seu trabalho (TRAMONTE et al., 2004) relatou que o aumento da espessura da lâmina própria tem sido relacionado à ocorrência de inflamação e edema frente a diferentes tipos de agressão. Sendo a lâmina própria a região da parede intestinal onde se encontram os vasos sanguíneos (VIEIRA-LOPES et al., 2014), poder-se-ia presumir que as alterações na espessura desta camada intestinal estariam relacionadas a processos vasculares reacionais secundários ao uso da TENS. Anteriormente foi observado na análise histológica do intestino delgado, reflexos na taxa de renovação de células epiteliais intestinais em leitões expostos a baixo fluxo placentário que apresentaram intestino delgado mais longo e mais fino, com altura de vilosidade reduzida em relação aos leitões de gestações normais. Enfim, foi observado que o peso ao nascimento estava ligado as alterações da morfologia intestinal, como indicado pela altura vilosa do íleo inferior em leitões com RCIU em relação aos leitões peso normal ao nascimento (HU et al., 2015). No presente estudo, não foram encontradas alterações significativas quanto à altura das vilosidades intestinais, possivelmente pelo efeito vasodilatador da TENS no

intestino fetal, minimizando as injúrias da restrição do fluxo sanguíneo intestinal secundário à insuficiência placentária.

Vários fatores podem influenciar na forma pela qual a TENS interfere em cada órgão fetal, como a frequência e intensidade utilizadas, tempo de tratamento e até a fase da gestação na qual o método foi aplicado. No presente estudo, utilizamos a TENS de alta frequência, seguindo estudos anteriores que mostraram aumento da perfusão tecidual por meio da aplicação da TENS no tecido randômico isquêmico em ratos (LIEBANO et al., 2003) e em gestações de mulheres com insuficiência placentária (KUBISTA et al., 1980), com uma baixa intensidade de estimulação, respeitando o limiar de tolerância máxima sem ativação muscular.

Anteriormente nosso grupo de estudo utilizando o mesmo modelo experimental encontrou vasoconstrição nos vasos sanguíneos placentários nos grupos submetidos a TENS sugerindo que os vasos placentários podem se comportar de forma particular frente a determinados estímulos, em relação a circulação sistêmica. A placenta carece de inervações autonômicas (MYATT, 1992), o que sugere que fatores dentro o ambiente local podem ser cruciais para esse fim. As influências relaxantes dos agonistas específicos de receptores de estrógeno diferem entre as artérias do miométrio e as artérias placentárias, isso sugere que a regulação estrogênica do tônus vascular das artérias uteroplacentárias ocorre de maneira específica e diferente de outros tecidos. O sangue da circulação uterina materna que atravessa o lúmen das arteríolas espirais é direcionado para a superfície sincicial da placenta, mas não entra em contato direto com o aparelho circulatório feto placentário, tornando importante o entendimento de como os vasos sanguíneos de cada órgão específico responde a fatores vasoativos fisiológicos (CORCORAN et al., 2014).

A dopamina também está envolvida na regulação do fluxo sanguíneo em diferentes leitos vasculares, segundo Amenta et al. (2000) e a administração *in vivo* ou *in vitro* de agonistas da dopamina induzem vasodilatação nos leitos vasculares mesentéricos, diferente dos vasos placentários, onde as respostas não são as mesmas com o objetivo de proteger o feto contra altos níveis circulantes de agentes vasoativos e ainda mesmo o aumento significativo nos níveis de catecolaminas (ASSALI et al., 1968; INGLIS et al., 1981; MAIGAARD et al., 1986; REVIRIEGO, MARIN, 1990; PHILLIPE, RYAN, 1981; PHILLIPE, 1983; TAKA et al., 1991; ALMEIDA et al, 1993). Em concordância com os trabalhos citados acima os achados do presente trabalho e do nosso grupo de estudo a

placenta apresentou resposta diferente às encontradas no intestino fetal frente ao estímulo da aplicação da TENS.

Há um extenso número de publicações que relata a maior expressão de GLUT-1 em condições de hipóxia (LUEDER e OGATA, 1990; HARIK et al., 1994; HARIK et al., 1996; DAS et al., 1999; CHANDRASIRI et al., 2013) inclusive em modelos de ratos com restrição de fluxo sanguíneo placentário. No presente estudo não houve alteração significativa na expressão do GLUT-1 no intestino fetal pelo estímulo da TENS e nem pela restrição do fluxo sanguíneo placentário. Provavelmente, no presente modelo, o efeito vasodilatador desencadeado pela aplicação da TENS, diminuiu o efeito da restrição do fluxo sanguíneo placentário impossibilitando uma expressão significativa do GLUT-1 no intestino dos fetos analisados.

8 CONCLUSÃO

A aplicação da TENS induziu aumento do calibre dos vasos na serosa e aumento da espessura da lâmina própria no intestino fetal, sugerindo um efeito vasodilatador do estímulo elétrico. A expressão de GLUT-1 no intestino não apresentou alterações significativas entre os grupos, provavelmente pelo efeito compensatório da vasodilatação induzida pela TENS, minimizando os efeitos da restrição do fluxo sanguíneo uterino no intestino fetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, S. E.; ASIDDAO, C. B.; REYNOLDS, A. C. Increased Skin Temperature during Transcutaneous Electrical Stimulation. **Anesthesia & Analgesia**, [s.l.], v. 59, n. 1, p.22-25, jan. 1980. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1213/00000539-198001000-00005>.

AJEENA, I. M. et al. Impact of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on endometrial thickness in the healthy women a step to improve the female fertility. v. 4, n. 2, p. 74–77, 2018.

ALMEIDA, J. A. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine D 1 receptors in the human umbilical artery. v. 234, p. 209–214, 1993.

AMENTA, F. et al. LOCALIZATION OF DOPAMINE RECEPTOR SUBTYPES IN SYSTEMIC ARTERIES. v. 22, n. 3, p. 277–288, 2000.

ASSALI, N.S., G. A. B.; MORRISON, I.W. Foetal and neonatal circulation, in: *Biology of Gestation*, ed. N.S. Assali (**Academic Press**, New York) Vol. II, p. 85. 1968.

ATALAY, C.; YILMAZ, K. B. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on postmastectomy skin flap necrosis. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.611-614, 15 fev. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-009-0335-z>.

BARRY, J. S. et al. Developmental changes in ovine myocardial glucose transporters and insulin signaling following hyperthermia-induced intrauterine fetal growth restriction. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 5, p. 566–575, 2006.

BASCHAT, A et al. Relationship between arterial and venous doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. **Ultrasound In Obstetrics And Gynecology**, [S. I.], v. 5, n. 16, p.407-413, 2000.

BASERGA, M. et al. Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats. v. 79, p. 93–105, 2004.

BASSI, J. A. et al. Fetal growth retardation due to maternal tobacco smoke exposure in the rat. **Pediatric Research**, v. 18, n. 2, p. 127–130, 1984.

BEDWELL, C. Why do women use Tens equipment and how effective is it? **British Journal of Midwifery**, v. 19, n. 6, p. 348–351, 2011.

BERNSTEIN, Iran M et al. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. **American Journal Of Obstetrics & Gynecology**, [S. I.], v. 1, n. 182, p.199-206, 2000.

BUENO, M. P. et al. Modelo experimental para restrição do crescimento fetal em ratos : efeito sobre o glicogênio hepático e morfometria intestinal e renal. p. 3–8, 2010.

CHANDRASIRI, U. P. et al. Insight Into the Pathogenesis of Fetal Growth Restriction in Placental Malaria: Decreased Placental Glucose Transporter Isoform 1 Expression. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 209, n. 10, p.1663-1667, 10 dez. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit803>.

CHEN, L.; GRÉGOIRE NYOMBA, B. L. Effects of prenatal alcohol exposure on glucose

tolerance in the rat offspring. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 52, n. 4, p. 454–462, 2003.

CHIN, Alana M. et al. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 66, p.81-93, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.011>.

CICOGNANI, A.; ALESSANDRONI, R.; PASINI, A.; PIRAZZOLI, P.; CÁSSIO, A.; BARBIERI, E.; CACCIARI, E. Low birth weight for gestational age and subsequent male gonadal function. **The Journal of Pediatrics**, v. 141, n. 3, p. 376-379, 2002.

CORCORAN, J. J. et al. Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17 β -estradiol and estrogen-receptor- specific agonists. v. 20, n. 5, p. 433–441, 2014.

D'INCA, R. et al. Intrauterine growth restriction reduces intestinal structure and modifies the response to colostrum in preterm and term piglets ☆. **Livestock Science**, v. 133, n. 1–3, p. 20–22, 2010.

DAS, U. G.; SCHROEDER, R.E.; HAY JR., W. W.; DEVASKAR, S. U. Time-dependent and tissuespecific effects of circulating glucose on fetal ovine glucose transporters. **The American Journal of Physiology**, v. 276, p. R809-R817, 1999.

DROZDOWSKI, L. A.; CLANDININ, T.; THOMSON, A. B. R. Ontogeny , growth and development of the small intestine : Understanding pediatric gastroenterology. v. 16, n. 7, p. 787–799, 2010.

ERGAZ, Z.; AVGIL, M.; ORNOY, A. Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models?. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.301-322, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.04.007>.

FUNG, C. M. et al. Intrauterine growth restriction alters mouse intestinal architecture during development. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2016.

GARDOSI, J et al. Customised antenatal growth charts. **The Lancet**, [S. I.], v. 1, n. 339, p.283-287, 1992.

GROSSE, A. S. et al. Cell dynamics in fetal intestinal epithelium : implications for intestinal growth and morphogenesis. v. 4432, p. 4423–4432, 2011.

GUIMARÃES, C. S. O. et al. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation and Placental Vascularization in Cases of Uterine Blood Flow Restriction Grazielle Pacheco Oleg ´. v. 32, n. 2, p. 88–96, 2013.

GUIMARÃES, C. S. O. et al. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on fetal and placental development in an experimental model of placental insufficiency. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 283–289, 2016.

HARIK, N.; HARIK, S. I.; KUO, N. T.; SAKAI, K.; PRYZBYLSKI, R. J.; LAMANNA, J. C. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density, **Brain Research**, v. 737, p. 335-338, 1996.

HARIK, S. I.; BEHMAND, A.; LAMANNA, J. C. Hypoxia increases glucose transport at

- blood-brain barrier in rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 77, p. 896-901, 1994.
- HU, L. et al. Postnatal nutritional restriction affects growth and immune function of piglets with intra-uterine growth restriction. p. 53–62, 2015.
- ILLSLEY, N.; HALL, S.; STACEY, T. **Troph. Res.**, v. 2, p. 535-544, 1987.
- INGLIS, G.C.; M.J. WHITTLE, A.I. WILSON; BULL, S. G. Plasma catecholamine concentrations in mother and infant at birth, **Clin. Sci.** 60, 25. 1981.
- J. S. WIGGLESWORTH. Fetal Growth Retardation. **American Journal of Pathology**, v. 77, p. 347–350, 1974.
- JANSSON, T. et al. Down-Regulation of Placental Transport of Amino Acids Precedes the Development of Intrauterine Growth Restriction in Maternal Nutrient Restricted Baboons. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 5, p. 98–98, 2006.
- JONES, I.; JOHNSON, M. I. Transcutaneous electrical nerve stimulation. **Continuing Education In Anaesthesia Critical Care & Pain**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.130-135, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkp021>.
- KONJE, J. C. et al. Longitudinal quantification of uterine artery blood volume flow changes during gestation in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. v. 110, n. March, p. 301–305, 2003.
- KUBISTA, E.; PHILIPP, K. The influence of TNS (transcutaneous nerve stimulation) on placental flow. **Zeitschrift für Geburtshilfe und Perinatologie**, v. 183, n. 1, p. 30–34, 1979.
- LIEBANO, R. E. et al. 8 - Experimental model for transcutaneous electrical nerve stimulation on ischemic random skin flap in rats 1. **Acta Cir Bras**, p. 54–59, 2003.
- LIN, C. C.; EVANS, M. I. Intrauterine growth retardation: pathophysiology and clinical management. New York: McGraw-Hill, 1984
- LUEDER, F. L.; OGATA, E. S. Uterine artery ligation in the maternal rat alters fetal tissue glucose utilization. *Pediatric Research*, v. 28, n. 5, p. 464-8, Nov., 1990.
- MACHADO, A. F. P. et al. Effect of high-and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on angiogenesis and wound contraction in acute excisional wounds in rat skin. **Fisioterapia em Movimento**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.671-680, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5918.030.004.ao02>.
- MAIGAARD, S.; FORMAN, A.; ANDERSON, K.E. Relaxant and contractile effects of some amines and prostanoids in myometrial and vascular smooth muscle within the human uteroplacental unit, **Acta Physiol. Scand.** 128, 33. 1986.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002.
- MCGUIRE, W. Preventing necrotising enterocolitis in very preterm infants : current evidence. **Paediatrics and Child Health**, v. 25, n. 6, p. 265–270, 2015.
- MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S.. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.571-633,

abr. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00053.2003>.

MIYATA, Takaki. Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular 'community'. **Development, Growth & Differentiation**, [s.l.], v. 50, p.105-112, 7 dez. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-169x.2007.00980.x>.

MORRISON, J. L. BRIEF REVIEW SHEEP MODELS OF INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION : FETAL ADAPTATIONS. n. December 2006, p. 730–743, 2008.

MYATT, L. Current Topic : Control of Vascular Resistance in the Human Placenta. p. 329–341, 1992.

NEWBY, E. A.; MYERS, D. A.; DUCSAY, C. A. Fetal endocrine and metabolic adaptations to hypoxia : the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. 2015.

NIH. he US National Institute of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. p. 85–23, 1996.

PAULO, I. C. et al. Preservative spleen surgery and hyperbaric oxygen therapy. **Acta Cir Bras**, v. 22 Suppl 1, n. 3, p. 21–28, 2007.

PHILLIPE, M.; RYAN, K.J. Catecholamines in human amniotic fluid, **Am. J. Obstet. Gynecol.** 139. 204. 1981.

PHILLIPE, M. Fetal catecholamines, **Am. J. Obstet. Gynecol.** 146, 840. 1983.

QUITAN, M. et al. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) in Patients with Pregnancy-Induced Low Back Pain and / or Pelvic Girdle Pain. p. 91–95, 2016.

REVIRIEGO, J., FERNANDEZ-ALFONSO, M.S.; MARIN, J. Actions of vasoactive drugs on human placental vascular smooth muscle, **Gen. Pharmacol.** 21,719. 1990.

SANTOS, F. V; CHIAPPA, G. R.; VIEIRA, P. J. C. Interferential electrical stimulation improves peripheral vasodilatation in healthy individuals. v. 17, n. 3, p. 281–288, 2013.

SWANSON, A. M.; DAVID, A. L. Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. **Placenta**, v. 36, n. 6, p. 623–630, jun. 2015.

TAKA, K.; KUDO T.; KISHIMOTO, Y. Effects of L-DOPA or dopamine on human decidual prostaglandin synthesis, **Acta Med. Okayama** 45, 333. 1991.

TEOLI, D.; AN, J. **Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS)**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2018.

THAMOTHARAN, M. GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 5, p. E935–E947, 2004.

TRAMONTE, R. et al. Alterações da mucosa intestinal em ratos : estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda 1. v. 19, n. 2, p. 120–125, 2004.

VARDHANA, P.; ILLSLEY, N. P. Transepithelial glucose transport and metabolism in BeWo choriocarcinoma cells. **Placenta**, v. 23, p. 653-660, 2002.

- VIEIRA LOPES, D. A. et al. Histologia e histoquímica do tubo digestório de *Phrynops geoffroanus* (Testudines , Chelidae). v. 44, n. 1, p. 135–142, 2014.
- VUGUIN, P. et al. Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2617–2622, 2004.
- WANG, T. et al. Effects of Intrauterine Growth Retardation on Development of the Gastrointestinal Tract in Neonatal Pigs. v. 210095, p. 66–72, 2005.
- WAWRYKÓW, A.; KORABIUSZ, K. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation as a method to relieve pain during childbirth. v. 8, n. 9, p. 543–548, 2018.
- WELLS, James M.; MELTON, Douglas A.. Vertebrate Endoderm Development. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.393-410, nov. 1999. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.393>.
- WIGGLESWORTH, J. S. Animal model of growth retardation. **The American Journal of Pathology**, v. 77, p. 374–350, 1974.
- YANAI, H. et al. Intestinal stem cells contribute to the maturation of the neonatal small intestine and colon independently of digestive activity. **Scientific Reports**, n. September 2016, p. 2–5, 2017.
- YOKOYAMA, L. M. et al. Low- and high-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation have no deleterious or teratogenic effects on pregnant mice. v. 101, p. 214–218, 2015.
- ZHANG Q, LI HS, Z. H. The effects of timing and causes of IUGR on gastro intestinal tract in newborn rats. **Zhonghua Erke Zazhi**, v. 35, p. 567–570, 1997.
- ZHANG, S. et al. Placental Adaptations in Growth Restriction. p. 360–389, 2015.
- ZHOU, J.; BONDY, C. A. Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 3, p. 845-852, 1993.
- ZORN, Aaron M.; WELLS, James M.. Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.221-251, nov. 2009. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113344>.

ANEXO 1

Anexo B



1/4

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da estimulação nervosa elétrica transcutânea na vascularização placentária de ratas com restrição induzida experimentalmente do fluxo útero placentário.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eumenia Costa da Cunha Castro

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 23/11/2006

PROTOCOLO CEUA UFTM: 35

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

Em placentas com baixo fluxo útero placentário induzido experimentalmente, comparar o número de vasos placentários em ratas com estímulo elétrico e sem estímulo elétrico.

2. JUSTIFICATIVA

A estimulação nervosa elétrica transcutânea (TENS) por anos vem sendo utilizada como importante recurso analgésico, mas seus efeitos na vascularização de tecidos isquêmicos ainda não estão esclarecidos. Frente aos altos índices de morbimortalidade fetal relacionados a gestações complicadas por restrição do crescimento intra-uterino e baseado em trabalhos que citam a TENS como forma de tratamento da insuficiência placentária, destaca-se a importância deste trabalho para avaliação dos reais efeitos da TENS na vascularização tecidual, a fim de que possa ser estabelecida como recurso terapêutico eficaz para melhora da perfusão placentária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais experimentais

Os grupos serão formados de acordo com o esquema abaixo:

1º Grupo: Ratas gestantes operadas com ligadura da artéria uterina e submetidas à estimulação elétrica nervosa transcutânea.

2º Grupo: Ratas gestantes operadas sem ligadura da artéria uterina e submetidas à estimulação nervosa elétrica transcutânea.

3º Grupo: Ratas gestantes operadas com ligadura da artéria uterina e não estimuladas.

4º Grupo: Ratas gestantes operadas sem ligadura e não estimuladas.

2. Estimativa do Ciclo Estral

3. Acasalamento

4. Indução da Restrição do Fluxo Útero-placentário

Ao 17º dia de gestação, as ratas grávidas serão submetidas à cirurgia de clampeamento da artéria uterina direita, para indução da insuficiência útero-placentária e restrição do crescimento intra uterino, seguindo o modelo experimental de Wigglesworth (1974). Como anestésico será utilizado pentobarbital sódico, 40 mg/kg, por via intraperitoneal. Será feita incisão mediana abdominal xifo-púbica. O número de sítios de implantação em cada corno uterino será avaliado, e então será feito o clampeamento da artéria uterina direita, através de nó simples com fio de náilon monofilamentado 4-0, assegurando que o único suprimento sanguíneo restante seja o da artéria ovariana. O corno uterino não-ligado servirá como controle. A síntese da parede



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

2/4

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da estimulação nervosa elétrica transcutânea na vascularização placentária de ratas com restrição induzida experimentalmente do fluxo útero placentário.
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eumenia Costa da Cunha Castro
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 23/11/2006
PROTOCOLO CEUA UFTM: 35

abdominal será feita em dois planos de sutura, sendo o plano peritônio-músculo aponeurótico realizado com pontos separados de fio de nylon monofilamentar 2-0, equidistantes 2 mm entre si e a pele será suturada com o mesmo fio, em pontos separados, equidistantes 5 mm entre si. Todos os procedimentos cirúrgicos deverão ser realizados sob condições de assepsia. Após a cirurgia as ratas serão alojadas em gaiolas individuais com aquecimento de fonte luminosa, e para a analgesia pós-operatória, será utilizado ácido acetilsalicílico diluído em água, na dose de 50 mg/kg.

5. Estimulação Elétrica dos Animais

A estimulação nervosa elétrica transcutânea será realizada a partir do pós-operatório imediato, até o parto. Será utilizado o aparelho de eletroestimulação com um cabo ligado a dois eletrodos de silicone (dimensões de 4,2 x 1,5 cm), acoplados à região lombar com gel e fixados com fita adesiva. A intensidade utilizada será de 10mA, frequência 80 Hz e duração de pulso 200 microsegundos. As sessões de eletroestimulação serão realizadas uma vez ao dia e cada sessão terá duração de 30 minutos.

6. Avaliação dos Fetos e Placentas

Serão coletados das placentas fragmentos próximos a inserção do cordão umbilical, fixados em formol a 10%, emblocados em parafina e posteriormente será realizada imunohistoquímica para fator VIII, para análise dos vasos placentários.

Análise estatística: Todas as variáveis coletadas serão expressas como média ± erro padrão. As variáveis paramétricas serão comparadas entre os grupos empregando-se a ANOVA de um fator de seguida do teste de Tukey, enquanto as não paramétricas serão avaliadas pelo teste de Kurskal-Wallis seguida do teste de Dunn. Serão consideradas estatisticamente significantes as diferenças com $p < 0,05$.

4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE PARA O USO DE ANIMAIS

O clampeamento da artéria uterina em ratas fornece um bom modelo de restrição do fluxo útero-placentário para o estudo da insuficiência placentária, uma vez que o procedimento em humanos seria inviável, e o período gestacional relativamente curto nesses animais facilita a avaliação dos resultados. Utilizaremos animais da mesma idade e linhagem uma vez que a variação inter-individual é relativamente pequena, justificando o uso de um pequeno número de animais por grupo (5 animais em cada grupo).

5. DESCRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA (espécie, procedência, número)

Serão utilizadas 20 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais serão mantidos em gaiolas, à temperatura ambiente, com ciclo luz-escuro de 12 h/12 h, luzes acesas às 7:00 h, água e alimentação padrão à vontade.



3/4

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da estimulação nervosa elétrica transcútânea na vascularização placentária de ratas com restrição induzida experimentalmente do fluxo útero placentário.
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eumenia Costa da Cunha Castro
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 23/11/2006
PROTOCOLO CEUA UFTM: 35

6. ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES (Detalhamento das instalações e demonstrativo da existência de infra-estrutura necessária, destino do material após o uso)
Disciplina de Fisiologia da UFTM possui infra-estrutura necessária para a pesquisa ser realizada.

7. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO
Não há nenhum desconforto ou risco para os animais uma vez que os mesmos serão submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos sob anestesia do pentobarbital sódico (40 mg/Kg, i.p.). Quanto à eutanásia, a mesma será realizada em animal previamente anestesiado através da administração de dose excessiva de anestésico por via endovenosa, a fim de provocar parada respiratória.

8. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA
Não pertinente.

9. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA E FONTE DE RECURSOS
Custo total do projeto =R\$33.000,00
O orçamento do Projeto será suprido com recursos disponibilizados pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pela Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

10. CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA
Não se aplica por se tratar de pesquisa experimental em animais sem risco algum para as pessoas envolvidas na execução do projeto.

11. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS
Não há riscos.

12. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO
O projeto apresenta justificativa e objetivos claros, materiais e métodos adequados, não colocando os animais utilizados em prejuízo, a não ser pelo fato de submeterem-se à cirurgia, porém é utilizado medicamento analgésico (como descrito na literatura). Quanto a utilização da técnica TENS poder gerar desconforto, cabe



4/4

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

**Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS****IDENTIFICAÇÃO****TÍTULO DO PROJETO:** Efeitos da estimulação nervosa elétrica transcutânea na vascularização placentária de ratas com restrição induzida experimentalmente do fluxo útero placentário.**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Eumenia Costa da Cunha Castro**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM**DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM:** 23/11/2006**PROTOCOLO CEUA UFTM:** 35

ao pesquisador evitar a ocorrência de dor durante a sessão, além da observação contínua desses animais para que os eletrodos não se desprendam e causem dor. Os materiais biológicos e as carcaças dos animais ao final do protocolo experimental serão incinerados.

PARECER DA CEUA: Aprovado**DATA DA REUNIÃO:** 16/07/2009
Dra. Ana Paula Sarreta Terra
Presidente da CEUA