

Camila Souza de Oliveira Guimarães

***EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NERVOSA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA NA
VASCULARIZAÇÃO PLACENTÁRIA DE RATAS COM RESTRIÇÃO INDUZIDA DO
FLUXO UTERINO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Rosana Rosa Miranda Corrêa

Co-orientador: Vicente de Paula Antunes Teixeira

Uberaba-MG

2008

Dedicatória

*Aos meus pais, **João Alfredo e Elisa**, pelo exemplo de vida e caráter, e pelo empenho em garantir a minha educação. Por acreditarem na minha capacidade e dividirem comigo todos os meus sonhos, me incentivando sempre.*

*Ao meu marido, **Gregório**, por ter me ajudado a vencer meus desafios com seu exemplo de determinação e perseverança, e ter contribuído diretamente para a realização deste trabalho com suas idéias, sugestões e grande ajuda. Por ser o meu amor, companheiro e incentivador, suportando inúmeros momentos de ausência, com a compreensão e o apoio que tanto me fortaleceram.*

*Ao meu irmão **Rafael**, pelo orgulho e a felicidade de tê-lo como irmão. Sua amizade e carinho são bens mais que preciosos.*

*À minha avó **Brígida**, por seus bons conselhos e orações, sempre torcendo por mim e vibrando com minhas conquistas, e em memória aos meus avós **Mira, Guego e Alfredinho**, com uma imensa saudade e a certeza de que também estão acompanhando minha vitória e dividem comigo a alegria desse momento.*

Agradecimentos

*A **Deus**, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente, sendo a minha certeza em todos os momentos.*

*À minha orientadora, **Rosana**, pela paciência e disponibilidade para ensinar a todo momento, com exemplos de conduta profissional e também pessoal, não só me mostrando os caminhos, mas me ajudando a percorrê-los. Pela dedicação, compromisso e competência com que conduziu esse trabalho, me guiando rumo à realização de um sonho.*

*Ao professor **Vicente**, por dividir seu conhecimento e experiência, sempre com sábias palavras e conselhos valiosos, que representam ensinamentos para toda a vida.*

*À professora **Eumenia**, por ter me dado a oportunidade que eu tanto buscava ao me abrir as portas da Patologia, e ter confiado no meu trabalho, dando o apoio e incentivo para que eu superasse meus próprios limites.*

*À professora **Marlene**, por sua importante colaboração, e pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos, não medindo esforços para ajudar.*

*Aos meus sogros - **Fernando e Luzia** -, meus cunhados - **Fernanda, Osvaldo, Antônio e Estela** -, meus sobrinhos - **Bárbara, Laura e Lucas** - e a todos meus **tios e primos**, pelo carinho, apoio e incentivo, e pela alegria dos momentos que passamos juntos.*

*Aos meus **amigos**, por compreenderem a minha “correria” e me mostrarem que o tempo e a distância não são capazes de apagar uma amizade de verdade.*

*Aos **companheiros de pós-graduação**, pela troca de experiências e bons momentos de convivência.
Em especial: Ana Carolina, Ana Paula, Camila Cavellani, Débora, Janainna, Mara, Milena, Renata Rossi e Renatinha.*

*Aos **funcionários da Disciplina de Patologia Geral da UFTM**: Aloísio, Edson, Elenemar, Lourimar, Maria Helena, Maria Prado, Pedro, Sônia, e Vandair.*

*Aos **professores Luiz Carlos e Valdo, Octávio, Ana Maria, Donizete, Fausto, Glauco e Margareth, da Disciplina de Fisiologia da UFTM**, pela colaboração e disponibilidade de utilização do biotério e animais experimentais.*

*À **Disciplina de Farmacologia da UFTM**, pela esterilização do material cirúrgico.*

*Aos **Professores Luiz César Peres e Paulo Quemelo, e à Deise**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela atenção com que sempre nos receberam.*

*Às **secretárias da pós-graduação, Denise e Nelma**, sempre simpáticas e prestativas.*

*Às **"ratinhas"**, pelo sacrifício de suas vidas a favor da pesquisa científica.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFIM), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP/UB), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos	10
Lista de Tabelas	12
Lista de Figuras.....	15
Resumo	17
Abstract.....	19
Introdução	22
Hipótese	32
Objetivos	
1. Objetivo Geral.....	32
2. Objetivos Específicos.....	32
Material e Métodos	
1. Animais Experimentais	34
2. Estimativa da Idade Gestacional	34
3. Acasalamento	35
4. Indução da Restrição do Fluxo Útero-placentário.....	36
5. Estimulação Elétrica dos Animais	36
6. Avaliação dos Fetos e Placentas	37
7. Morfometria dos Vasos Placentários	39
8. Análise Estatística	39
Resultados.....	42
Discussão	58
Conclusões.....	69
Referências Bibliográficas	71

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANG: angiopoietinas

BSA: albumina bovina sérica

CE: grupo de ratas gestantes operadas submetidas ao clampeamento da artéria uterina e submetidas à estimulação nervosa elétrica transcutânea

cm: centímetros

cm³: centímetros cúbicos

CS: grupo de ratas gestantes operadas submetidas ao clampeamento da artéria uterina e não submetidas à estimulação nervosa elétrica transcutânea

D: diâmetro placentário

DAB: 3'3 diaminobenzidina

F: teste ANOVA

FE: grupo de ratas gestantes operadas, nas quais foi apenas passado o fio em tono da artéria uterina direita e estimuladas

FGF: fator de crescimento fibroblástico

FS: grupo de ratas gestantes operadas nas quais foi apenas passado o fio em tono da artéria uterina direita e não estimuladas

g: gramas

h: horas

H: teste Kruskal-Wallis

Hz: Hertz

H₂O₂: água oxigenada

i.p.: intra peritoneal

IP: índice ponderal

kg: quilograma

L1: primeira vértebra lombar

mA: miliampère

mg: miligrama

ml: mililitro

μ L: microlitro

μ m: micrômetro

μ s: microssegundo

n: número de casos

NaCl: cloreto de potássio

NIH: *National Institute of Health*

PIGF: fator de crescimento placentário

PBS: solução salina tamponada com fosfato

RCIU: restrição de crescimento intra-uterino

TENS: Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea

t: teste t de student

T: teste de Mann-Whitney

T10: décima vértebra torácica

US: *United States*

V: volume placentário

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SP: São Paulo

S2: segunda vértebra sacral

S4: quarta vértebra sacral

$X \pm DP$: média \pm desvio padrão

χ^2 : teste do qui-quadrado

Lista de Tabelas

Tabela 1. Peso das ratas (g) nos dias do acasalamento, da cirurgia e da eutanásia, comparado entre os grupos	42
Tabela 2. Número de fetos e de reabsorções entre os grupos de ratas analisadosa.....	42
Tabela 3. Porcentagem de reabsorções em relação ao número total de fetos por grupo.....	43
Tabela 4. Comparação do peso fetal em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks).....	44
Tabela 4A. Comparação do peso fetal em relação ao procedimento	44
Tabela 4B. Comparação do peso fetal em relação ao estímulo	45
Tabela 4C. Comparação do peso fetal em relação interação entre o procedimento e o estímulo.....	45
Tabela 5. Comparação do comprimento fetal em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)	46
Tabela 5A. Comparação do comprimento fetal em relação ao procedimento	47

Tabela 5B. Comparação do comprimento fetal em relação ao estímulo	47
Tabela 5C. Comparação do comprimento fetal em relação interação entre o procedimento e o estímulo.....	47
Tabela 6. Comparação do peso placentário em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)	49
Tabela 6A. Comparação do peso placentário em relação ao procedimento	50
Tabela 6B. Comparação do peso placentário em relação ao estímulo.....	50
Tabela 6C. Comparação do peso placentário em relação interação entre o procedimento e o estímulo.....	50
Tabela 7. Comparação do volume placentário em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)	52
Tabela 7A. Comparação do volume placentário em relação ao procedimento.....	52
Tabela 7B. Comparação do volume placentário em relação ao estímulo	53
Tabela 7C. Comparação do volume placentário em relação interação entre o procedimento e o estímulo.....	53

Tabela 8. Comparação do número de vasos placentários em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)	54
Tabela 8A. Comparação do número de vasos placentários em relação ao procedimento ..	54
Tabela 8B. Comparação do número de vasos placentários em relação ao estímulo.....	55
Tabela 8C. Comparação do número de vasos placentários em relação interação entre o procedimento e o estímulo	55

Lista de Figuras

Figura 1. Suprimento sanguíneo dos órgãos reprodutores femininos em ratas.....	24
Figura 2. Suprimento sanguíneo dos órgãos reprodutores femininos, evidenciando o suprimento ovariano	24
Figura 3. Determinação do ciclo estral através da análise a fresco do fluído vaginal	32
Figura 4. Cirurgia para clampeamento da artéria uterina.....	34
Figura 5. Estimulação elétrica dos animais.....	36
Figura 6. Análise morfológica dos fetos e placentas.	39
Figura 7. Correlação entre o número de fetos e de reabsorções.....	43
Figura 8. Correlação entre o peso fetal e o número de fetos por rata	45
Figura 9. Correlação entre o comprimento fetal e o número de fetos por rata	48
Figura 10. Correlação entre o comprimento fetal nos casos estimulados e o número de fetos por rata	48

Figura 11. Correlação entre o peso placentário e o número de fetos por rata.....	50
Figura 12. Correlação entre o peso placentário e o peso fetal	51
Figura 13. Correlação entre o volume placentário e o número de fetos por rata	53
Figura 14. Comparação entre os grupos do desenvolvimento dos cornos uterinos, dos fetos e das placentas.....	54
Figura 15. Correlação entre número de vasos placentários e número de fetos por rata.....	55
Figura 16. Correlação entre o número de vasos placentários nos casos com fio e o número de fetos por rata.....	56
Figura 17. Correlação entre o número de vasos placentários nos casos estimulados e o número de fetos por rata	56

Resumo

Introdução: Frente aos altos índices de morbimortalidade fetal relacionados a gestações complicadas por insuficiência placentária e restrição do crescimento intra-uterino e baseado em trabalhos que citam a Estimulação Nervosa Elétrica Transcutânea (TENS) como forma de tratamento da insuficiência placentária, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da TENS sobre o desenvolvimento fetal e placentário em gestações com restrição do fluxo sanguíneo útero-placentário induzido experimentalmente por meio do clampeamento da artéria uterina. **Material e métodos:** Foram analisadas dezesseis ratas de linhagem Wistar, submetidas à cirurgia de clampeamento da artéria uterina direita no décimo quinto dia de gestação, das quais quatro foram incluídas no grupo de animais com clampeamento da artéria uterina e submetidas à TENS (CE), quatro no grupo com clampeamento e não submetidas à TENS (CS), quatro no grupo em que foi passado fio em torno da artéria uterina e com estímulo (FE) e quatro no grupo com fio e sem estímulo. As sessões de eletroestimulação foram realizadas desde o pós-operatório imediato, até o décimo nono dia de gestação, com duração de trinta minutos por sessão, uma sessão ao dia. No décimo nono dia de gestação as ratas foram eutanasiadas, e os fetos e placentas foram pesados e medidos. Para análise dos vasos placentários, foi realizada a técnica de imunohistoquímica para fator VIII. **Resultados:** Os casos com clampeamento apresentaram maior número de reabsorções fetais ($p=0,017$). O peso fetal foi menor nos casos com clampeamento ($p<0,001$) e com estímulo ($p=0,01$). O comprimento fetal foi menor nos casos com clampeamento ($p<0,001$) e com estímulo ($p=0,002$). O peso placentário foi menor nos casos com clampeamento ($p<0,001$) e com estímulo ($p<0,001$). O volume placentário foi menor nos casos com clampeamento ($p<0,001$) e com estímulo ($p=0,016$).

Os casos com estímulo apresentaram menor número de vasos placentários ($p < 0,001$), independente do procedimento ($p = 0,828$). Houve correlação positiva entre o número de fetos e reabsorções ($p = 0,00444$), entre o peso placentário e o peso fetal ($p < 0,001$) e, nos casos estimulados, entre o número de vasos placentários e número de fetos ($p = 0,0131$). Houve correlação negativa entre o comprimento fetal e o número de fetos nos casos estimulados ($p = 0,0150$). **Conclusões:** O estímulo não aumentou o número de vasos placentários e parece não ter uma contribuição benéfica para o desenvolvimento fetal e placentário em ratas com restrição do fluxo uterino. Sugere-se que a TENS seja usada com cautela durante a gestação, pois seus parâmetros de utilização podem ter efeitos prejudiciais para o desenvolvimento intra-uterino.

Palavras-chave: fluxo sanguíneo; restrição; TENS; vascularização placentária

Abstract

Introduction: Based on the high levels of fetal morbidity and mortality related to pregnancies complicated by placental insufficiency and intra uterine growth restriction, and based on studies using Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) as a treatment for placental insufficiency, the aim of this study was to evaluate the effect of TENS on fetal and placental development in pregnancies with restricted uteroplacental blood flow was experimentally induced by clamping the uterine artery. **Material and Methods:** In the study were included sixteen Wistar rats, submitted to uterine artery clamping surgery at day fifteen of pregnancy. Four were included in the group of animals with uterine artery clamping and submitted to TENS (CE), four in the group with clamp and without electrostimulation, four in the group in which a filament was passed around the uterine artery and stimulated (FE) and four in the group in which a filament and not stimulated. The surgery was performed on the 15th day of pregnancy, and the electrostimulation sessions were performed since the immediate postoperative until day nineteen of pregnancy, with duration of 30 minutes, one session per day. On day nineteen of pregnancy, animals were subjected to euthanasia, and fetuses and placentas were weighted and measured. To analyze the number of placental vessels, immunohistochemistry was performed with Factor VIII. **Results:** Cases with clamp presented a higher number of fetal reabsorptions ($p=0.017$). Fetal weight was smaller in cases with clamp ($p<0.001$) and stimulated ($p=0.01$). Fetal length was smaller in cases with clamp ($p<0.001$) and stimulated ($p=0.002$). Placental weight was smaller in cases with clamp ($p<0.001$) and stimulated ($p<0.001$). Placental volume was smaller in cases with clamp ($p<0.001$) and stimulated ($p=0.016$). Cases which were stimulated presented a smaller number of placental vessels ($p<0.001$), independent from procedure ($p=0.828$).

There was a positive correlation between number of fetuses and reabsorptions ($p=0.00444$), between placental and fetal weights ($p<0.001$) and between number of placental vessels and number of fetuses in cases stimulated ($p=0.0131$). There was a negative correlation between fetal length and number of fetuses in cases stimulated ($p=0.0150$). **Conclusions:** Stimulus did not elevated the number of placental vessels and seems not to have a beneficial contribution to fetal and placental development in rats with uterine flow restriction. We suggest that TENS should be used cautiously during pregnancy, because its parameters of utilization may have harmful effects to intra-uterine development.

Key-words: blood flow; placental vascularization; restriction; TENS

Introdução

A placenta é o órgão através do qual gases respiratórios, nutrientes e resíduos são trocados entre os sistemas materno e fetal, e a troca transplacentária provê a subsistência de todas demandas metabólicas para o desenvolvimento e crescimento fetal (REYNOLDS & REDMER, 2001). A placentação, processo de formação da placenta, inclui extensiva neovascularização, acompanhada por aumento nos fluxos sanguíneos uterino e umbilical (ASSHETON, 1906; GREISS & ANDERSON, 1970; REYNOLDS *et al.*, 1984; REYNOLDS, 1986; REYNOLDS & REDMER, 1992; REYNOLDS & REDMER, 1995; MAGNESS, 1998).

A formação de vasos sanguíneos se desenvolve através de dois processos diferentes, chamados vasculogênese e angiogênese (DEMIR *et al.*, 2007). Durante a vasculogênese, células progenitoras endoteliais - os angioblastos - formam uma rede vascular primitiva (RISAU & FLAME, 1995), enquanto a angiogênese representa o desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (FOLKMAN & SHING, 1992).

A angiogênese é um processo crucial para o crescimento tecidual e desenvolvimento normal (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987; KLAGSBRUN & D'AMORE, 1991; REYNOLDS *et al.*, 1992). Não somente o aumento sustentado do fluxo sanguíneo no útero gravídico e umbilical dependem do desenvolvimento dos leitos vasculares placentários, mas o crescimento placentário em si depende da angiogênese placentária, desde que o crescimento tecidual de qualquer magnitude não pode ocorrer na ausência do crescimento vascular (BASSINGTHWAIGHTE & GORESKY, 1984). Apesar de inúmeros fatores terem sido implicados na angiogênese, observações recentes têm levado à identificação dos principais fatores que regulam o processo, incluindo aqueles que ocorrem durante a vascularização placentária. Esses fatores angiogênicos incluem o fator

de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e a família de angiopoietinas (ANG), assim como seus respectivos receptores (KLAGSBRUN & D'AMORE, 1991; BREIER *et al.*, 1997; FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997; HANAHAN, 1997; NEUFELD *et al.*, 1999).

As taxas do fluxo sanguíneo placentário, por sua vez, são dependentes da vascularização placentária, necessária para o desenvolvimento de descendentes viáveis e saudáveis (REYNOLDS & REDMER, 2001). Os fluxos sanguíneos uterino e umbilical, que representam a circulação para as porções materna e fetal da placenta, respectivamente, aumentam exponencialmente durante toda a gestação, essencialmente acompanhados pelo crescimento fetal (MESCHIA, 1983; REYNOLDS & REDMER, 1995; MAGNESS, 1998). Devido ao fato da função primária da placenta ser prover a subsistência de trocas fisiológicas, a importância da circulação placentária também tem sido reconhecida há tempos e é exemplificada pela estreita relação entre peso fetal, tamanho da placenta, e o fluxo sanguíneo uterino e umbilical durante a gestação normal em muitas espécies de mamíferos (ASSHETON, 1906; BARCROFT, 1946; RAMSEY, 1982; FABER & THORNBURG, 1983; REYNOLDS & REDMER, 1995; MAGNESS, 1998). Estudos têm indicado que a angiogênese é realmente o principal componente do aumento no fluxo sanguíneo placentário durante toda a gestação (REYNOLDS *et al.*, 2005).

A taxa de troca transplacentária depende primeiramente da taxa dos fluxos sanguíneos uterino (materno-placentário) e umbilical (feto-placentário). De fato, o aumento da resistência vascular uterina e a redução do fluxo sanguíneo uterino podem ser utilizados como prognóstico de gestação de alto risco, e estão associados com a restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) (REYNOLDS & REDMER, 2001). O fluxo sanguíneo adequado para a placenta é crucial para o desenvolvimento fetal normal, e não é surpreendente que condições que afetam o crescimento fetal como o

genótipo materno e fetal, o número aumentado de fetos, o excesso ou privação de nutrientes maternos, o estresse térmico ambiental e condições de alta altitude tipicamente têm efeitos semelhantes no tamanho da placenta, e também estão associadas com taxas reduzidas de oxigênio fetal e absorção de nutrientes, assim como a angiogênese placentária e o fluxo sanguíneo reduzidos (WALTON & HAMMOND, 1938).

A RCIU em humanos é caracterizada por fluxos sanguíneos uterino (materno-placentário) e umbilical (feto-placentário) prejudicados, levando a reduzida absorção de nutrientes, assim como hipóxia fetal, hipoglicemia e alterações no crescimento dos órgãos (PARDI *et al.*, 1993). Além disso, a resistência vascular uterina aumentada e o fluxo sanguíneo uterino reduzido durante o começo da gestação podem ser utilizados como prognóstico de gestações de alto risco e estão associados com a RCIU (TRUDINGER *et al.*, 1985), demonstrando que o desenvolvimento vascular placentário desempenha um papel central em garantir uma troca transplacentária adequada, e finalmente, o peso fetal ao nascer (MESCHIA, 1983).

O crescimento fetal caracteriza-se por uma seqüência de crescimento de tecidos e órgãos, diferenciação e maturação que são determinados pela oferta materna e transferência placentária de substratos e pelo potencial de crescimento determinado pelo genoma (CALDERON *et al.*, 1999). No início da vida fetal o maior determinante do crescimento é o genoma fetal, mas no final da gestação tornam-se importantes o ambiente intra-uterino, a nutrição e a influência hormonal (CUNNINGHAM *et al.*, 2001). A nutrição intra-uterina adequada é condição ímpar para o crescimento e desenvolvimento normais do feto, constituindo fator primordial para a determinação do peso ao nascer (GRUENWALD, 1966; LANG *et al.*, 2000).

Os recém-nascidos com RCIU podem ser classificados em três categorias: simétrico, assimétrico e intermediário. A RCIU simétrica, também denominada hipoplásica, intrínseca ou proporcional, é decorrente da ação de fatores etiológicos que atuam no início da gravidez, isto é, na fase de "hiperplasia celular", reduzindo o número de células de todos os órgãos. Esses recém-nascidos têm pior prognóstico em relação aos assimétricos, são mais suscetíveis às ações mórbidas no decorrer da gestação e durante o parto (DAIKOKU *et al.*, 1979; BITAR, 1998). O tipo assimétrico ou desproporcional tem como agentes etiológicos fatores que atingem a gravidez no início do terceiro trimestre, com déficit no crescimento celular (hipotrofia celular), fato que origina a desproporção observada entre o tamanho da cabeça (que permanece com o volume das células normais) e do corpo (que sofre redução no volume celular), representado principalmente pela redução da circunferência abdominal, visto que o fígado é um dos órgãos mais afetados, caracterizando os recém-nascidos magros, com estatura normal e pólo cefálico proporcionalmente grande (HADLOCK, 1996; CUNNINGHAM *et al.*, 2001). A RCIU intermediária ou mista sofre ação dos agentes causadores nas duas fases de crescimento celular, a de hiperplasia e a de hipertrofia (BITAR, 1998). Devido à dificuldade de conceituação, com base em diferentes critérios de definição e dos diagnósticos empregados, a incidência é variável, calculando-se entre 2% a 10% (TENOVUO *et al.*, 1988). A morbimortalidade elevada nos recém-nascidos com RCIU é associada a alterações metabólicas, asfixia, síndrome do desconforto respiratório, hemorragia intracraniana, aspiração meconial, hipotermia e outros (LIN & EVANS, 1984). Estudos epidemiológicos mostram que o crescimento fetal restrito está associado a repercussões tardias como alterações no desenvolvimento físico, neuro-psicomotor e intelectual, risco de hipertensão arterial, triglicérides séricos elevados, alterações endócrinas e subfertilidade (CICOGNANI *et al.*, 2002). O fluxo sanguíneo placentário prejudicado associado à

redução da distribuição de oxigênio e nutrientes ao feto através da placenta é uma das causas mais comuns de gravidez complicada por restrição do crescimento (WLODEK *et al.*, 2005).

A insuficiência placentária experimental mostra-se como importante meio de simulação da RCIU em humanos. Os modelos em animais possibilitam o estudo da placenta e da circulação placentária há tempos, e muito do conhecimento sobre o desenvolvimento vascular placentário continua a ser originado de estudos comparativos entre animais e humanos (KAUFMANN *et al.*, 2004).

O suprimento sanguíneo para os órgãos reprodutivos da fêmea é obtido de diversas fontes. A artéria ovariana, um ramo direto da aorta, nutre o ovário e ramifica-se para a tuba uterina e para parte cranial do corno do útero. A artéria ovariana assume um trajeto extraordinariamente contorcido e, dependendo da espécie, está mais ou menos relacionada com a veia ovariana. O ramo uterino une-se por anastomose com a artéria uterina dentro do ligamento largo. A artéria uterina emerge como um ramo indireto da artéria ilíaca interna e segue adiante dentro do ligamento largo. Emite uma série de ramos anastomosantes para o corno e o corpo do útero; as anastomoses mais craniais são com a artéria ovariana e as mais caudais, com a artéria vaginal. Assim, uma arcada arterial estabelece-se, percorrendo a extensão do útero e suprimindo ambas as extremidades, cranial e caudal (DYCE, 2004).

Em estudos experimentais foram utilizadas ratas grávidas submetidas a clampeamento dos vasos uterinos no 17º dia de gestação como modelo de restrição do crescimento fetal. Foram realizadas uma ou mais ligaduras em torno dos vasos uterinos próximo à porção inferior de um dos cornos; o corno não ligado serviu como controle. Os animais foram eutanasiados de quatro a cinco dias depois, encontrando-se vários fetos com restrição do crescimento no corno ligado, e alguns fetos que não sobreviveram (WIGGLESWORTH, 1974). Além da redução global no tamanho corporal, a variação nos

pesos dos órgãos é semelhante àquela encontrada em humanos. O peso cerebral é mantido à custa do desvio sangüíneo de órgãos internos como fígado, pulmões e rins (BLANC, 1967; GRUENWALD, 1963). O modelo de RCIU em ratos demonstra a importância do suprimento sangüíneo uterino como um fator de controle no crescimento fetal (WIGGLESWORTH, 1974). Ainda, fornece meios de se produzir o retrato da RCIU num experimento internamente controlado, em que os fetos de peso normal do corno não-ligado representam um bom controle para os fatores relacionados ao crescimento fetal, e ainda estão expostos aos mesmos fatores do corno clampeado, como a saúde materna, o fornecimento de nutrientes, e os efeitos da restrição do crescimento (HOHENAUER & OH, 1969).

A utilização de correntes elétricas terapêuticas constitui um dos vários recursos utilizados na fisioterapia. Uma vez moduladas em parâmetros apropriados, estas correntes podem atuar em diferentes condições, como promover analgesia, contrações musculares, melhoria do fluxo circulatório muscular, incentivar a recomposição e a cicatrização de diversos tecidos corporais (STARKEY, 2001). Uma das principais correntes elétricas terapêuticas utilizadas em processos algicos agudos e crônicos, chamada TENS (Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation), cuja tradução do inglês refere-se a uma Estimulação Nervosa Elétrica Transcutânea, é usada com a finalidade de influenciar e modular o processo de neurocondução da dor e atuar sobre a liberação de opióides endógenos (RUSHTON, 2002).

O aparelho de eletroestimulação nervosa transcutânea é um gerador de pulsos balanceados que envia impulsos elétricos através da pele. É um aparelho de corrente com frequência que pode variar de 1Hz a 250Hz, do tipo bidirecional e assimétrico, não provocando ionização. Possui dois canais independentes, com quatro eletrodos que foram desenvolvidos para evitar a formação de pontos quentes e conseqüentemente, lesões

cutâneas do tipo queimadura (FERREIRA & PAYNO, 2002). A corrente elétrica gerada pelo aparelho é transmitida através dos fios elétricos até o eletrodo aplicado sobre a pele do paciente. Estes farão contato com a pele através de um elemento de condução intersticial (gel), sendo fixados por uma película adesiva. Existem diversos protocolos para a utilização da TENS, que variam de acordo com a largura e a frequência de pulso utilizada. Os mais utilizados são a TENS de alta frequência, baixa frequência (ou acupuntura), a breve intensa e a chamada *burst* (GUIRRO & GUIRRO, 2004).

A TENS é um recurso não farmacológico para alívio da dor aguda e crônica, baseado na Teoria das Comportas (MELZACK & WALL, 1965). Consiste na aplicação de eletrodos percutâneos que emitem uma corrente elétrica com forma de onda tipicamente bifásica, simétrica ou assimétrica, com o objetivo de excitar as fibras nervosas, com mínimos efeitos adversos para os pacientes (LAMPE, 1993; GUIRRO & GUIRRO, 2004).

Na prática clínica, a TENS é predominantemente utilizada para alívio sintomático da dor, embora haja um uso crescente da TENS como antiemético e para restauração do fluxo sanguíneo para tecidos isquêmicos e feridas. Os efeitos da TENS na circulação, entretanto, ainda não foram bem compreendidos. Há poucas pesquisas publicadas e os trabalhos experimentais realizados apresentam resultados contraditórios (JOHNSON, 2003). A estimulação elétrica pode ser usada para melhorar a perfusão vascular periférica através de um ou dois mecanismos possíveis: de maneira reflexa, pela ativação dos nervos autônomos, ou pela contração muscular, que age como uma bomba ou como um estímulo para as fibras aferentes através de um reflexo somatossimpático simulado (CLEMENT & SHEPHERD, 1976). A vasodilatação cutânea ocorre na área de aplicação de alguma estimulação elétrica de intensidade suficiente. Considera-se que isso ocorra devido à estimulação de nervos sensoriais causando vasodilatação arteriolar, ativando primeiro o

reflexo axônico e subseqüentemente a liberação de substâncias semelhantes à histamina (WADSWORTH & CHANMUGAN, 1980). Os efeitos da TENS na vasodilatação periférica foi investigado através da aplicação da estimulação elétrica a várias porções do sistema nervoso e avaliação do aumento do fluxo sanguíneo nas extremidades. Doze dos treze pacientes submetidos à estimulação elétrica na coluna vertebral ou raízes dorsais tiveram dilatação arterial em uma ou mais extremidades (DOOLEY & KASPRAK, 1976). O desenvolvimento de um modelo experimental foi proposto para verificar o efeito da TENS na viabilidade do retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos, demonstrando que o modelo experimental é factível (LIEBANO *et al.* 2003).

A TENS é usada extensivamente em locais de atendimento à saúde (POPE *et al.*, 1995; REEVE *et al.*, 1996; JOHNSON, 1997; ROBERTSON & SPURRITT, 1998). As contra-indicações para TENS são poucas e hipotéticas, com poucos casos relatados na literatura de eventos adversos associados (JOHNSON, 2003).

Em mulheres no primeiro trimestre da gravidez os efeitos da TENS no desenvolvimento fetal são ainda desconhecidos. Para reduzir o risco de induzir o parto, a TENS não deve ser administrada sobre o útero durante a gestação, embora seja rotineiramente administrada na coluna vertebral para aliviar a dor durante o parto (JOHNSON, 2003). Dentre os vários recursos existentes para controle da dor do trabalho de parto, a TENS desponta como opção interessante, constituindo em um método comprovadamente seguro, de baixo custo e isento de efeitos colaterais para o binômio materno fetal (KAPLAN *et al.*, 1997). A técnica consiste basicamente em administrar impulsos ou estímulos elétricos de baixa voltagem através de eletrodos colocados sobre a pele. Embora possa ser aplicada a qualquer momento durante o trabalho de parto, a maior efetividade é observada nas fases iniciais (GENTZ, 2001). Pesquisas demonstram a

utilização de um aparelho portátil com dois pares de eletrodos auto-adesivos posicionados na região paravertebral, na altura de T10-L1 (que corresponde à inervação do útero e cérvix), e S2-S4 (inervação do canal do parto e assoalho pélvico). Nestes casos é observada uma boa aceitação da paciente e tolerância ao uso desse recurso. O aparelho é religado nos momentos de pausa para avaliação dos batimentos cardíacos fetais, e mantido no segundo estágio do trabalho de parto, não sendo requisitado recurso farmacológico de alívio de dor (FERREIRA *et al.*, 2004).

A TENS lombo-sacral em humanos foi utilizada para aumentar a perfusão placentária em pacientes com diminuição do fluxo útero-placentário. Os resultados demonstraram um nítido aumento da perfusão placentária avaliada através do método de radioisótopos. (KUBISTA & PHILIPP, 1979, KUBISTA *et al.*, 1980, KUBISTA, 1981).

Estes achados sugerem que a TENS pode ser usada com propósito terapêutico nos casos de disfunção placentária, mas são poucos os trabalhos publicados em relação ao uso da TENS como fator que auxilia no aumento da perfusão placentária, ou ainda, em relação aos efeitos não analgésicos da TENS. Portanto, este trabalho foi realizado utilizando um modelo experimental com a finalidade de esclarecer as repercussões do uso da TENS em gestações com baixa perfusão sanguínea placentária, enfatizando as alterações morfológicas fetais e placentárias encontradas.

Hipótese e Objetivos

Hipótese

A TENS aumenta o número de vasos placentários, melhorando a perfusão placentária e diminuindo os efeitos nocivos da hipóxia induzida experimentalmente em ratas através do clameamento da artéria uterina.

Objetivo Geral

Comparar os efeitos da TENS entre ratas com e sem clameamento da artéria uterina durante a gestação.

Objetivos Específicos

1. Comparar o peso e o tamanho dos fetos e placentas em ratas com baixo fluxo sanguíneo uterino induzido experimentalmente, submetidas ou não à TENS.
2. Comparar número de vasos placentários em ratas com baixo fluxo sanguíneo uterino induzido experimentalmente, submetidas ou não à TENS.

Material e Métodos

1. Animais Experimentais

Foram utilizadas dezesseis ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, provenientes do biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais foram mantidos em gaiolas, com ciclo luz-escuro de 12 h/12 h, acesas às 7:00 h, água e alimentação padrão à vontade. Todos os procedimentos experimentais empregados neste projeto estiveram de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *The US National Institute of Health* (NIH, 1996). Os grupos foram formados de acordo com o esquema abaixo:

1º Grupo: (n=4). Ratas gestantes operadas, submetidas ao clampeamento da artéria uterina direita e submetidas à estimulação nervosa elétrica transcutânea (CE).

2º Grupo: (n=4). Ratas gestantes operadas, submetidas ao clampeamento da artéria uterina direita e não submetidas à estimulação nervosa elétrica transcutânea (CS).

3º Grupo: (n=4). Ratas gestantes operadas, nas quais foi apenas passado o fio em torno da artéria uterina direita e estimuladas (FE).

4º Grupo: (n=4). Ratas gestantes operadas, nas quais foi apenas passado o fio em torno da artéria uterina direita e não estimuladas (FS).

A primeira letra da sigla se refere ao procedimento cirúrgico utilizado (Clampeamento ou Fio), e a segunda se refere à estimulação (grupos Com ou Sem estimulação).

2. Estimativa da Idade Gestacional

A avaliação da idade gestacional foi feita através da estimativa do ciclo estral de cada rata, segundo critérios estabelecidos na literatura (MARCONDES *et al.*, 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 fluido 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.

3. Acasalamento

A ovulação ocorre do começo de Proestro até o final da fase Estro (YOUNG *et al.*, 1941; SCHWARTZ, 1964, MARCONDES *et al.*, 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 espermatozóides, 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, acompanhadas pela aferição diária da circunferência abdominal e ganho de peso de cada rata. O dia em que foram observados espermatozóides no fluido vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação.

4. Indução da Restrição do Fluxo Útero-placentário

No 15º dia de gestação, as ratas grávidas foram submetidas à cirurgia de clampeamento da artéria uterina direita, para indução da insuficiência útero-placentária e restrição do crescimento intra-uterino, baseada no modelo experimental de Wigglesworth (WIGGLESWORTH, 1974). 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 feito o clampeamento da artéria uterina direita, através de um nó simples com fio *nylon* monofilamentar 5-0, assegurando que o único suprimento sangüíneo restante era o da artéria ovariana (Figura 4A). O corno uterino não-ligado foi utilizado 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, eqüidistantes dois milímetros entre si, utilizando fio *nylon* monofilamentar 4-0. A pele foi suturada com o mesmo fio, em pontos separados, eqüidistantes 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 permaneceu até a eutanásia. (PAULO *et al.*, 2007).

5. Estimulação Elétrica dos Animais

A TENS foi realizada do pós-operatório imediato até o parto. Foi utilizado um aparelho de eletroestimulação digital com um cabo ligado a dois eletrodos de silicone, acoplados à região lombar, previamente tricotomizada, utilizando gel como meio de condução. No pós-operatório imediato, em que o animal ainda estava anestesiado, os

eletrodos foram fixados com fita adesiva. Nas sessões posteriores, em que o animal não estava anestesiado, foi utilizado esparadrapo para melhor fixação dos mesmos. A intensidade utilizada variou entre 4 e 6 mA, frequência de 80 Hz e duração de pulso de 200 μ s, seguindo critérios estabelecidos na literatura (LIEBANO *et al.*, 2003). As sessões de eletroestimulação foram realizadas uma vez ao dia e cada sessão teve duração de 30 minutos.

6. Avaliação dos Fetos e das Placentas

No 19º dia de gestação, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.), e submetidas à eutanásia com cloreto de potássio. Foi realizada a cirurgia para retirada dos fetos e placentas, que posteriormente foram pesados e medidos. Para obtenção do diâmetro e espessura placentários, em decorrência da forma discóide do bolo placentário, foram determinados dois diâmetros, perpendiculares entre si (D1 e D2). Estes foram obtidos com régua milimétrica com a placenta colocada em superfície plana, com a face materna em contato com essa superfície. O diâmetro placentário (D) correspondeu à média aritmética dos diâmetros D1 e D2. A espessura placentária foi obtida no ponto de intersecção dos dois diâmetros e denominada altura H. O volume placentário foi determinado admitindo-se que a placenta seria uma fatia de um cilindro, com a seguinte fórmula: $V = \pi/4 \times D \times H$, onde V = volume, D = diâmetro e H = altura (DEL NERO *et al.*, 2002).

As placentas foram perfundidas com solução de soro fisiológico para retirada do excesso de sangue, e o fragmento próximo à inserção do cordão umbilical foi coletado, fixado em formaldeído a 10% e enviado para rotina histológica. A morfologia placentária foi observada pela coloração de Hematoxilina e Eosina, e posteriormente foi realizada a técnica de imunohistoquímica para fator VIII, Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrant Factor, para análise dos vasos placentários. Os cortes de 4 a 5 μ m 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 o tampão citrato. Os fragmentos submetidos ao tampão citrato permaneceram vinte minutos em estufa a 97° e depois foram resfriados em temperatura ambiente pelo mesmo tempo. Foram realizados banhos com tampão PBS 0,05M + Triton[®] X-100 0,05%. A inibição da peroxidase endógena foi feita com H₂O₂ 3%, em tampão PBS + Triton X-100 0,05%, à temperatura ambiente, e no escuro, por 1 hora e 15 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 *over-night* e diluição 1:50. 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 6 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.

7. Morfometria dos vasos placentários

Após a técnica de imunohistoquímica o material foi analisado em um microscópio de luz comum, acoplado a uma câmera para captura de imagens, e ligado a um computador com um sistema analisador de imagens (*KS300 – Kontron Zeiss®*) para quantificação da porcentagem dos vasos placentários imunomarcados. Foram avaliados 30 campos, estabelecidos através do Método da Média Acumulada (WILLIAMS, 1977), utilizando o aumento de 400x. Foram quantificadas todas as áreas imunomarcadas em cada campo.

8. Análise Estatística

Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica no Microsoft Excell®. As informações foram analisadas utilizando-se o programa eletrônico SigmaStat® versão 2.0. Para avaliar os efeitos dos procedimentos e do estímulo, e sua interação num mesmo indivíduo, foi feito o teste Two Way ANOVA (F), utilizando valores *rankeados* para as distribuições não normais, seguido pelo teste de Tukey, quando necessário. Para análise dos diferentes procedimentos entre os grupos, nos casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste One Way ANOVA (F) para comparação entre três ou mais grupos, 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) na comparação entre três ou mais grupos, 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). Para análise do estímulo entre os grupos, nos casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste t de *student* (t) para comparação entre dois grupos. 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 Mann-Whitney (T) para comparação entre dois grupos. Neste tipo de distribuição os resultados foram expressos em mediana e valores mínimo e máximo (Med - Min - Max). As variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

O presente estudo foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, protocolo número 35.

Resultados

Não houve diferença significativa na comparação da média do peso das ratas entre os grupos analisados (Tabela 1). Os casos com clampeamento apresentaram maior número de reabsorções fetais ($p=0,017$) (Tabela 2). A porcentagem de reabsorções em relação ao número total de fetos por grupo foi maior nos casos com clampeamento e com estímulo, sendo de 35,71%, e nos casos com clampeamento e sem estímulo, sendo de 36,11% ($p=0,023$) (Tabela 3). Houve uma correlação positiva e significativa entre o número de fetos e de reabsorções ($rS:0,492$; $p=0,00444$) (Figura 7).

Tabela 1. Peso das ratas (g) nos dias do acasalamento, da cirurgia e da eutanásia comparado entre os grupos

Grupos	Peso das ratas (g)											
	n (%)	Acasalamento			Cirurgia			Eutanásia				
		Med	Min	Max	n (%)	Med	Min	Max	n (%)	Med	Min	Max
CE	3 (21,4)	280	250	340	4 (25,0)	325	300	395	3 (21,4)	335	295	400
CS	4 (28,6)	270	245	330	4 (25,0)	325	290	380	4 (28,6)	330	265	385
FE	3 (21,4)	240	235	300	4 (25,0)	330	280	370	3 (21,4)	290	275	350
FS	4 (28,6)	285	230	315	4 (25,0)	340	270	355	4 (28,6)	340	280	355
Total	14 (100)	H=3,615; $p=0,306$			16 (100)	H=2,675; $p=0,445$			14 (100)	H=6,849; $p=0,077$		

CE (com clampeamento e com estímulo), CS (com clampeamento e sem estímulo), FE (Com fio e com estímulo) e FS (Com fio e sem estímulo). Méd: Mediana. Min: Mínimo. Max: Máximo

Tabela 2. Número de fetos e de reabsorções entre os grupos de ratas analisados

Grupos	n (%)	Número de fetos		Número de reabsorções	
		Média \pm DP	Mediana	Mínimo	Máximo
CE	4 (25)	6,88 \pm 2,59	1,0	0,0	4,0
CS	4 (25)	7,00 \pm 2,98	0,5	0,0	5,0
FE	4 (25)	5,25 \pm 2,87	0,0	0,0	0,0
FS	4 (25)	6,13 \pm 1,89	0,0	0,0	4,0
Total	16 (100)	F=0,763; $p=0,525$	H=10,235; $p=0,017$		

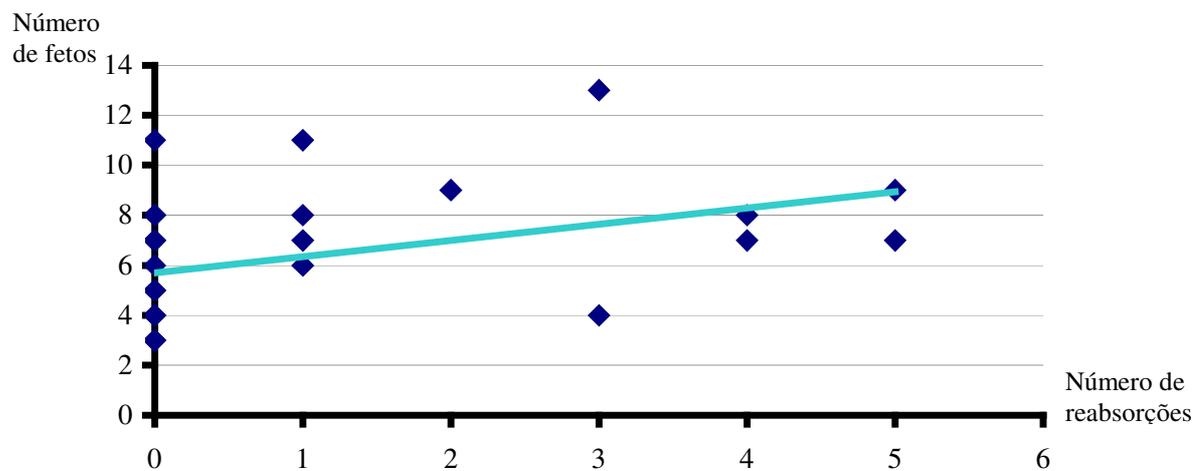
CE (com clampeamento e com estímulo), CS (com clampeamento e sem estímulo), FE (Com fio e com estímulo) e FS (Com fio e sem estímulo)

Tabela 3. Porcentagem de reabsorções em relação ao número total de fetos por grupo

Grupos	Número de fetos	Número de reabsorções	% Reabsorções
CE	28	10	35,71*
CS	36	13	36,11*
FE	22	0	0
FS	30	4	13,33
Total	116	27	23,28

* $\chi^2=9,488$; $p=0,023$. CE (com clampeamento e com estímulo), CS (com clampeamento e sem estímulo), FE (Com fio e com estímulo) e FS (Com fio e sem estímulo).

Figura 7. Correlação entre o número de fetos e de reabsorções



Teste de Correlação de Spearman ($r_s:0,492$; $p=0,00444$)

Peso Fetal

Houve diferença significativa do peso fetal em relação à aplicação do procedimento ($p < 0,001$) e do estímulo ($p = 0,001$), avaliados de forma isolada (Tabela 4). Com relação à influência do procedimento, os fetos do corno clampeado apresentaram peso significativamente menor quando comparados aos fetos do corno contralateral ao clampeamento. Distribuição semelhante foi observada em relação ao corno com fio e seu contralateral ($p < 0,001$) (Tabela 4A). Os casos estimulados apresentaram menor peso fetal ($p = 0,01$) (Tabela 4B). Embora não tenha ocorrido interação significativa do procedimento com o estímulo, o peso fetal foi menor nos casos com clampeamento e com estímulo ($p = 0,068$) (Tabelas 4 e 4C). Houve correlação negativa e não significativa entre o peso fetal e o número de fetos por rata ($rS: -0,131$; $p = 0,06$).

Tabela 4. Comparação do peso fetal em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)

Intervenções	Peso fetal	
	F	p
Procedimento	19,360	<0,001
Estímulo	10,505	0,001
Procedimento x Estímulo	2,417	0,068

Tabela 4A. Comparação do peso fetal em relação ao procedimento

Procedimento	n (%)	Peso fetal (g)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Corno clampeado	64 (32,17)	0,87 ^{1,3}	0,10	1,80
Corno com fio	49 (24,63)	1,10 ²	0,10	1,60
Corno contralateral ao clampeado	47 (23,61)	1,20 ¹	0,10	1,80
Corno contralateral ao fio	39 (19,59)	1,25 ^{2,3}	0,90	1,95
Total	199 (100)	*H=38,953; $p < 0,001$		

*1,2,3. Dunn: $p < 0,05$

Tabela 4B. Comparação do peso fetal em relação ao estímulo

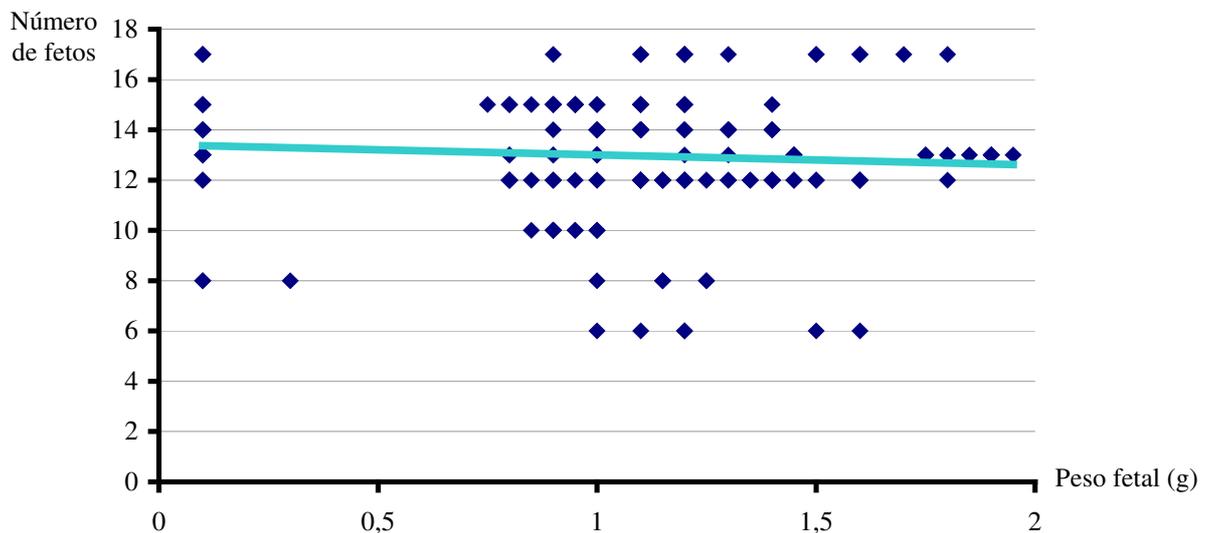
Estímulo	n (%)	Peso fetal (g)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com estímulo	97 (48,75)	1,00	0,10	1,95
Sem estímulo	102 (51,25)	1,15	0,10	1,80
Total	199 (100)	T=8654,500; p=0,010		

Tabela 4C. Comparação do peso fetal em relação à interação entre procedimento e estímulo

Procedimento e Estímulo	n (%)	Peso fetal (g)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com clampeamento e com estímulo	28 (24,77)	0,80	0,10	1,10
Com clampeamento e sem estímulo	22 (19,46)	0,95	0,10	1,80
Com fio e com estímulo	36 (31,85)	1,05	0,10	1,60
Com fio e sem estímulo	27 (23,89)	1,10	0,10	1,30
Total	113 (100)			

Two Way Anova on Ranks - F=2,417; p=0,068

Figura 8. Correlação entre o peso fetal e o número de fetos por rata



Teste de Correlação de Spearman (rS:-0,131; p=0,06)

Comprimento Fetal

Houve diferença significativa do comprimento fetal em relação à aplicação do procedimento ($p < 0,001$) e do estímulo ($p < 0,001$) avaliados de forma isolada, e da interação entre os dois ($p = 0,008$) (Tabela 5). Com relação à influência do procedimento, os fetos do corno clampeado apresentaram comprimento significativamente menor quando comparados aos fetos do corno contralateral ao clampeamento. Distribuição semelhante foi observada em relação ao corno com fio e seu contralateral. O comprimento fetal nos cornos com clampeamento foi menor que o observado nos cornos com fio ($p < 0,001$) (Tabela 5A). Os casos estimulados apresentaram menor comprimento fetal ($p = 0,002$) (Tabela 5B). Os efeitos dos diferentes procedimentos possuíram interação significativa com o estímulo em relação ao comprimento fetal, que foi menor nos casos com clampeamento e com estímulo ($p = 0,008$) (Tabelas 5 e 5C). Houve uma correlação negativa e significativa entre o comprimento fetal e o número de fetos por rata ($r_s: -0,219$; $p = 0,00196$) (Figura 9). Entre os grupos, os casos com estímulo apresentaram uma correlação negativa e significativa entre o comprimento fetal e o número de fetos por rata ($r_s: -0,247$; $p = 0,0150$) (Figura 10).

Tabela 5. Comparação do comprimento fetal em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)

Intervenções	Comprimento fetal	
	F	p
Procedimento	18,299	<0,001
Estímulo	14,632	<0,001
Procedimento x Estímulo	4,077	0,008

Tabela 5A. Comparação do comprimento fetal em relação ao procedimento

Procedimento	n (%)	Comprimento fetal (cm)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Corno clampeado	64 (32,16)	1,65 ^{1,3,4}	0,30	2,50
Corno com fio	49 (24,62)	1,90 ^{2,3}	0,80	2,50
Corno contralateral ao clampeado	47 (23,61)	2,00 ¹	0,50	2,60
Corno contralateral ao fio	39 (19,59)	2,20 ^{2,4}	1,70	2,60
Total	199 (100)	*H = 36,172; p<0,001		

*1,2,3,4. Dunn: p<0,05

Tabela 5B. Comparação do comprimento fetal em relação ao estímulo

Estímulo	n (%)	Comprimento fetal (cm)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com estímulo	97 (48,74)	1,90	0,30	2,50
Sem estímulo	102 (51,25)	2,10	0,50	2,60
Total	199 (100)	T = 8442,000; p = 0,002		

Tabela 5C. Comparação do comprimento fetal em relação à interação entre procedimento e estímulo

Procedimento e Estímulo	n (%)	Comprimento fetal (cm)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com clampeamento e com estímulo	28 (24,77)	1,40	0,30	2,10
Com clampeamento e sem estímulo	22 (19,46)	1,80	0,50	2,50
Com fio e com estímulo	36 (31,85)	1,90	1,00	2,50
Com fio e sem estímulo	27 (23,89)	2,10	0,80	2,40
Total	113 (100)			

Two Way Anova on Ranks - F= 4,077; p=0,008

Figura 9. Correlação entre o comprimento fetal e o número de fetos por rata

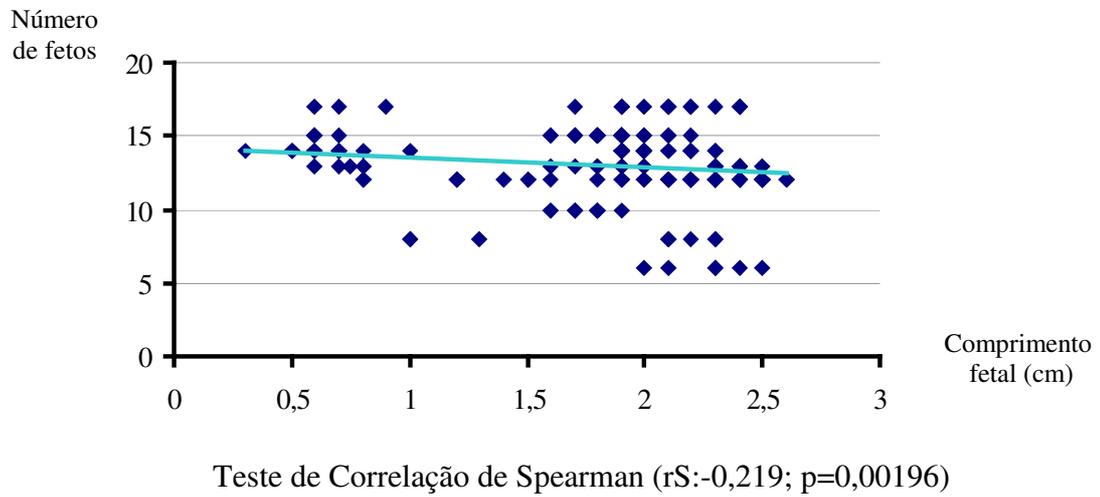
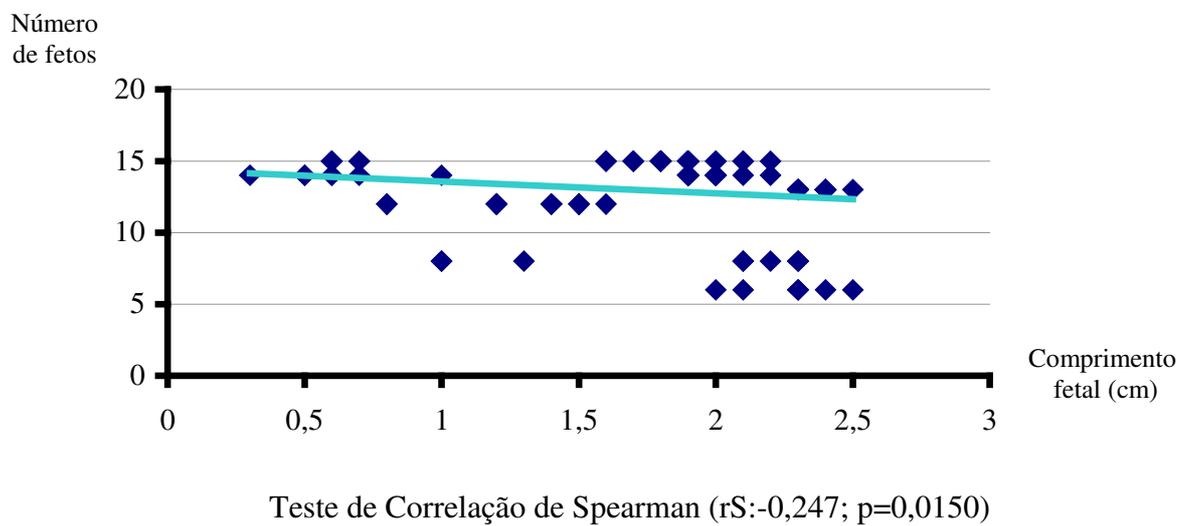


Figura 10. Correlação entre o comprimento fetal nos casos estimulados e o número de fetos por rata



Peso placentário

Houve diferença significativa do peso placentário em relação à aplicação do procedimento ($p < 0,001$) e do estímulo ($p = 0,003$), avaliados de forma isolada (Tabela 6). Com relação à influência do procedimento, as placentas do corno clampeado apresentaram peso significativamente menor quando comparadas às placentas do corno contralateral ao clameamento. O peso placentário do corno clampeado foi menor que os casos com fio. O peso das placentas nos cornos contralaterais ao clameamento foi menor que o observado nos cornos contralaterais ao fio ($p < 0,001$) (Tabela 6A). Os casos estimulados apresentaram menor peso placentário ($p < 0,001$) (Tabela 6B). O peso placentário foi menor nos casos com clameamento e com estímulo, embora não tenha ocorrido interação significativa entre procedimento e estímulo ($p = 0,331$) (Tabelas 6 e 6C). Houve correlação positiva e não significativa entre o peso placentário e o número de fetos de cada rata ($r_s: 0,140$; $p = 0,06$) (Figura 11). Houve correlação positiva e significativa entre o peso placentário e o peso fetal ($r_s: 0,700$; $p < 0,001$) (Figura 12).

Tabela 6. Comparação do peso placentário em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)

Intervenções	Peso placentário	
	F	p
Procedimento	18,189	<0,001
Estímulo	9,134	0,003
Procedimento x Estímulo	1,149	0,331

Tabela 6A. Comparação do peso fetal em relação ao procedimento

Procedimento	n (%)	Peso placentário (g)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Corno clampeado	55 (30,38)	0,10 ^{1,2,4}	0,10	0,50
Corno com fio	46 (25,41)	0,30 ²	0,15	0,75
Corno contralateral ao clampeado	44 (24,30)	0,30 ^{1,3}	0,10	0,70
Corno contralateral ao fio	36 (19,88)	0,38 ^{3,4}	0,20	0,60
Total	181 (100)	*H = 36,505; p<0,001		

*1,2,3,4. Dunn: p<0,05

Tabela 6B. Comparação do peso placentário em relação ao estímulo

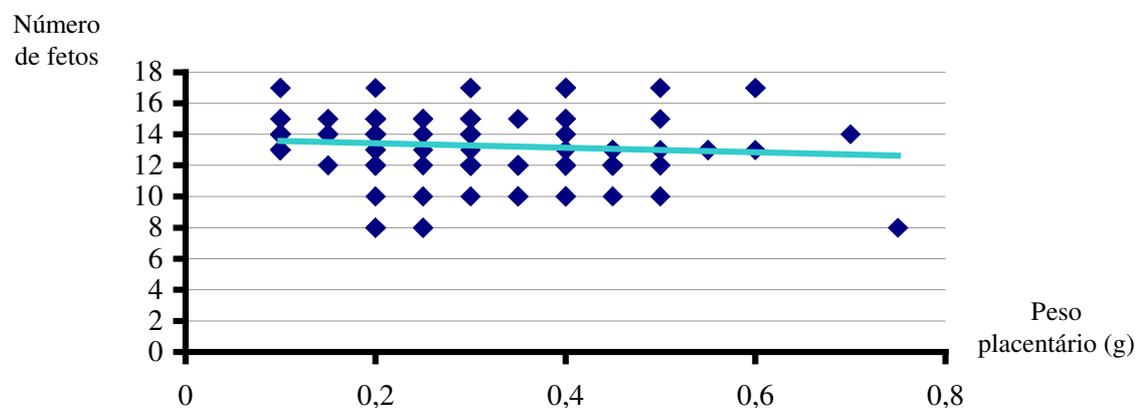
Estímulo	n (%)	Peso placentário (g)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com estímulo	79 (37,26)	0,20	0,10	0,75
Sem estímulo	133 (62,73)	0,35	0,10	0,60
Total	212 (100)	T = 6936; p<0,001		

Tabela 6C. Comparação do peso placentário em relação à interação entre procedimento e estímulo

Procedimento e Estímulo	n (%)	Peso placentário (g)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com clampeamento e com estímulo	19 (16,96)	0,10	0,10	0,25
Com clampeamento e sem estímulo	36 (32,14)	0,25	0,10	0,50
Com fio e com estímulo	19 (16,96)	0,25	0,15	0,75
Com fio e sem estímulo	38 (33,92)	0,30	0,15	0,45
Total	112 (100)			

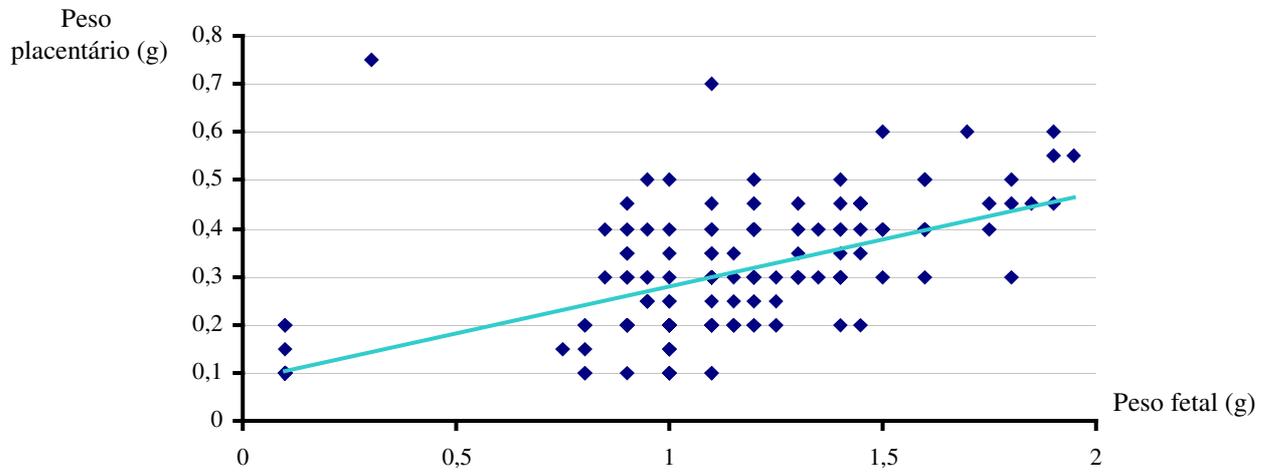
Two Way Anova on Ranks - F=1,149; p=0,331

Figura 11. Correlação entre o peso placentário e o número de fetos por rata



Teste de Correlação de Spearman (rS:0,140; p=0,06)

Figura 12. Correlação entre o peso placentário e o peso fetal



Teste de Correlação de Spearman ($r_s:0,700$; $p<0,001$)

Volume placentário

Houve diferença significativa do volume placentário em relação à aplicação do procedimento ($p < 0,001$) e do estímulo ($p = 0,025$), avaliados de forma isolada (Tabela 7). Com relação à influência do procedimento, as placentas do corno clampeado apresentaram volume significativamente menor quando comparadas às placentas do corno com fio. O volume placentário nos cornos contralaterais ao clampeamento foi menor que o observado nos cornos contralaterais ao fio ($p < 0,001$) (Tabela 7A). Os casos estimulados apresentaram menor volume placentário ($p = 0,016$) (Tabela 7B). Os efeitos dos diferentes procedimentos possuíram interação significativa com o estímulo em relação ao volume placentário, que foi menor nos casos com clampeamento e com estímulo ($p < 0,001$) (Tabelas 7 e 7C). Houve correlação negativa e não significativa entre o volume placentário e o número de fetos de cada rata ($rS: -0,0372$; $p = 0,613$) (Figura 13). Foi feita a ilustração da comparação do desenvolvimento dos cornos uterinos, dos fetos e das placentas (Figura 7).

Tabela 7. Comparação do volume placentário em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)

Intervenções	Volume placentário	
	F	p
Procedimento	33,877	<0,001
Estímulo	5,118	0,025
Procedimento x Estímulo	10,674	<0,001

Tabela 7A. Comparação do volume placentário em relação ao procedimento

Procedimento	n (%)	Volume placentário (cm ³)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Corno clampeado	55 (29,57)	0,20 ^{1,3}	0,03	0,47
Corno com fio	49 (26,35)	0,36 ^{1,4}	0,14	0,61
Corno contralateral ao clampeado	43 (23,12)	0,25 ^{2,4}	0,09	0,51
Corno contralateral ao fio	39 (20,96)	0,37 ^{2,3}	0,24	0,61
Total	186 (100)	*H = 62,289; $p < 0,001$		

*1,2,3,4. Dunn: $p < 0,05$

Tabela 7B. Comparação do volume placentário em relação ao estímulo

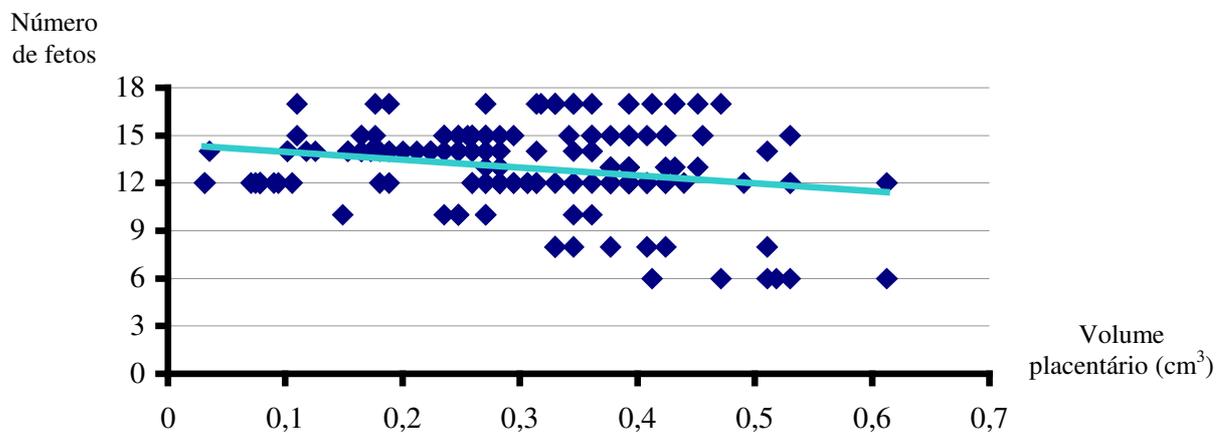
Estímulo	n (%)	Volume placentário (cm ³)
		Média ± DP
Com estímulo	97 (52,16)	0,28 ± 0,13
Sem estímulo	89 (47,84)	0,32 ± 0,09
Total	186 (100)	t = -2,440; p= 0,016

Tabela 7C. Comparação do volume placentário em relação à interação entre procedimento e estímulo

Procedimento e Estímulo	n (%)	Volume placentário (cm ³)
		Média ± DP
Com clampeamento e com estímulo	28 (26,93)	0,15 ± 0,08
Com clampeamento e sem estímulo	27 (25,96)	0,28 ± 0,11
Com fio e com estímulo	22 (21,15)	0,38 ± 0,09
Com fio e sem estímulo	27 (25,96)	0,33 ± 0,09
Total	104 (100)	

Two Way Anova on Ranks - F=10,674; p<0,001

Figura 13. Correlação entre o volume placentário e o número de fetos por rata



Teste de Correlação de Spearman (rS:-0,0372; p=0,613)

Vasos Placentários

Houve diferença significativa do número de vasos placentários em relação à aplicação do estímulo avaliado de forma isolada ($p < 0,001$) (Tabela 8). Com relação à influência do procedimento sobre o número de vasos placentários, não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,828$) (Tabela 8A). Os casos estimulados apresentaram menor número de vasos placentários ($p < 0,001$) (Tabela 8B). Independente do procedimento, os casos com estímulo apresentaram menor número de vasos placentários ($p = 0,643$) (Tabelas 8 e 8C). Houve correlação positiva e significativa entre o número de vasos placentários e o número de fetos por rata ($r_s: 0,146$; $p = 0,047$) (Figura 15). Entre os grupos, nos casos em que foi passado o fio em torno da artéria uterina, houve uma correlação positiva e não significativa entre o número de vasos placentários e o número de fetos por rata ($r_s: 0,197$; $p = 0,0795$) (Figura 16). Nos casos estimulados, houve uma correlação positiva e significativa entre o número de vasos placentários e o número de fetos por rata ($r_s: 0,260$; $p = 0,0131$) (Figura 17).

Tabela 8. Comparação do número de vasos placentários em relação às intervenções utilizadas (Two Way Analysis of Variance on Ranks)

Intervenções	Número de vasos	
	F	p
Procedimento	0,735	0,532
Estímulo	32,234	<0,001
Procedimento x Estímulo	0,559	0,643

Tabela 8A. Comparação do número de vasos placentários em relação ao procedimento

Procedimento	n (%)	Número de vasos (%)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Corno clampeado	62 (33,33)	3,63	0,43	6,76
Corno com fio	42 (22,58)	3,70	0,69	6,02
Corno contralateral ao clampeado	44 (23,66)	3,76	0,58	5,47
Corno contralateral ao fio	38 (20,43)	3,69	0,28	4,92
Total	186 (100)	H = 0,889; p = 0,828		

Tabela 8B. Comparação do número de vasos placentários em relação ao estímulo

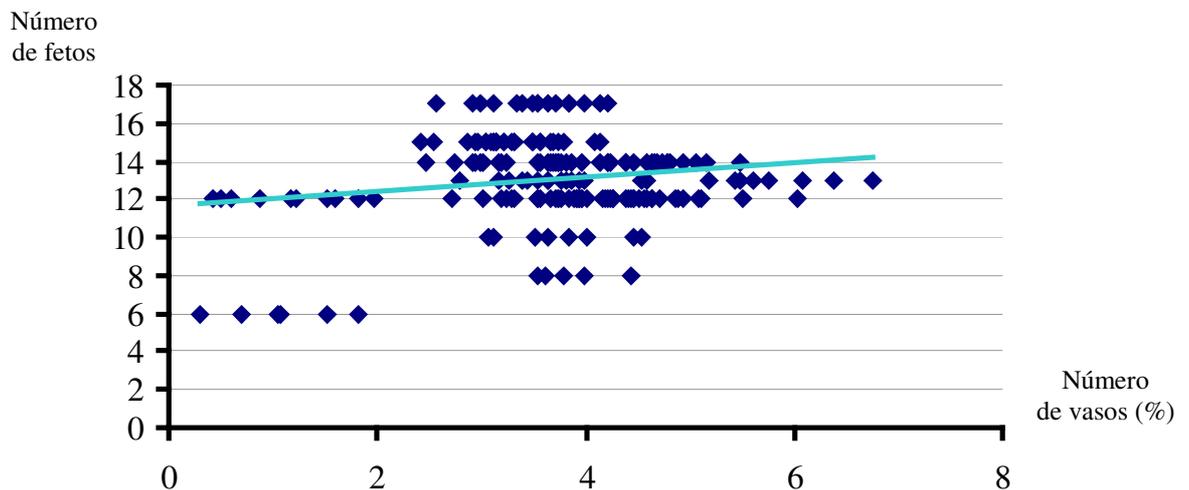
Estímulo	n (%)	Número de vasos (%)		
		Mediana	Mínimo	Máximo
Com estímulo	91 (48,92)	3,44	0,28	5,47
Sem estímulo	95 (51,08)	3,95	2,57	6,76
Total	186 (100)	T =6592,500; p<0,001		

Tabela 8C. Comparação do número de vasos placentários em relação à interação entre procedimento e estímulo

Procedimento e Estímulo	n (%)	Número de vasos (%)
		Mean \pm DP
Com clampeamento e com estímulo	27 (20,77)	3,01 \pm 1,39
Com clampeamento e sem estímulo	35 (26,93)	4,13 \pm 1,02
Com fio e com estímulo	19 (14,61)	3,07 \pm 0,98
Com fio e sem estímulo	23 (17,69)	4,21 \pm 0,79
Corno contralateral ao clampeamento e com estímulo	26 (20,00)	3,55 \pm 1,05
Total	130 (100)	

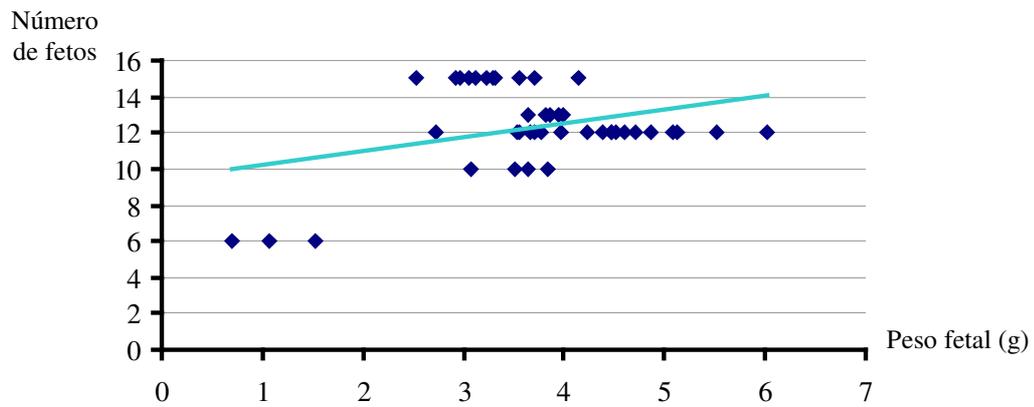
Two Way Anova on Ranks - F=0,559; p=0,643

Figura 15. Correlação entre o número de vasos placentários e o número de fetos por rata



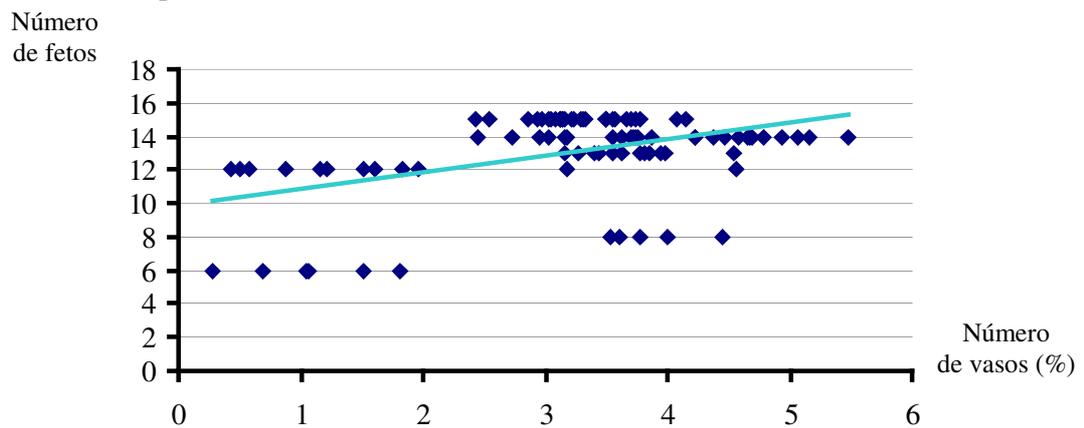
Teste de Correlação de Spearman (rS:0,146; p=0,047)

Figura 16. Correlação entre o número de vasos placentários nos casos com fio e o número de fetos por rata



Teste de Correlação de Spearman (rS: 0,197; p=0,0795)

Figura 17. Correlação entre o número de vasos placentários nos casos estimulados e o número de fetos por rata



Teste de Correlação de Spearman (rS:0,260; p=0,0131)

Discussão

A análise das alterações que ocorrem durante a gestação ainda possui algumas limitações, principalmente quando se refere a procedimentos realizados durante o período gestacional e suas repercussões intra-uterinas. Muitas doenças gestacionais ainda não possuem etiologia esclarecida, e ainda, devido à alta frequência das complicações após o nascimento, torna-se necessária a utilização de modelos experimentais que contribuam para análise destas alterações, bem como das possíveis intervenções realizadas precocemente, ainda durante a gestação.

O peso das ratas entre os grupos analisados foi semelhante durante o acasalamento, cirurgia e eutanásia. Estes dados são importantes, pois demonstram um padrão de desenvolvimento gestacional, e uma homogeneidade, sem grandes variações entre os grupos, de acordo com cada período avaliado e as intervenções utilizadas (REICHENHEIM & MORAES, 1998).

Os casos com clampeamento apresentaram maior número de reabsorções fetais, independente do estímulo. A ligação da artéria uterina causa uma completa obstrução do suprimento sanguíneo para os fetos localizados na porção mais caudal do corno uterino. O único suprimento sanguíneo do útero depois da ligação é derivado da artéria ovariana, resultando na sobrevivência dos fetos na porção cranial do corno uterino, e na parte caudal, morte e reabsorção parcial de cerca de 30% dos fetos (WIGGLESWORTH, 1964). Esta frequência é semelhante à encontrada neste estudo, onde os casos com clampeamento e com estímulo apresentaram uma frequência de reabsorções de 35,71%, e nos casos com clampeamento e sem estímulo, de 36,11%. Em nossos dados foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre o número de reabsorções e o número de fetos por rata. De acordo com a literatura, a limitação de espaço intra-uterino e abdominal materno

provocada por um grande número de fetos é um fator importante para o desenvolvimento de reabsorções durante a gestação (DYCE, 2004).

Os fetos do corno clampeado apresentaram menor peso e comprimento. A insuficiência útero-placentária reduz a oferta de oxigênio e nutrientes ao feto causando restrição de crescimento (OGATA *et al.*, 1986; MUGHAL *et al.*, 1989; OGATA *et al.*, 1990; LANE *et al.*, 1996; RAJAKUMAR *et al.*, 1998; FAROUF SADIK, 1999; REID *et al.*, 1999), sendo que os fetos são afetados gradualmente, a partir do ponto de clampeamento, por todo o corno uterino, alteração refletida pela diminuição do peso e comprimento fetal (WIGGLESWORTH, 1964). Os cornos em que foi passado o fio em torno da artéria uterina apresentaram menor peso e comprimento fetal quando comparado ao corno contralateral. A pseudo-operação pode causar uma alteração metabólica, pois o meio intra-uterino é afetado pelo menos temporariamente pela a cirurgia e pela recuperação pós-operatória (NÜSKEN *et al.*, 2008), refletindo um atraso do desenvolvimento causado pelo estresse cirúrgico (OGATA *et al.*, 1986; WLODEK *et al.*, 2005). Portanto, não só a ligação da artéria uterina, mas também a pseudo-operação, podem resultar em RCIU e suas potenciais seqüelas metabólicas.

O estímulo contribuiu para diminuição do peso e do comprimento fetal, mas não foram encontrados dados na literatura relacionando a influência da TENS sobre o peso fetal. Neste estudo, o estímulo contribuiu para redução da maioria das medidas fetoplacentárias avaliadas, indicando um possível efeito prejudicial da TENS durante a gestação. Reforçando esta hipótese, foi observada uma redução maior do peso e do comprimento fetal nos casos clampeados submetidos ao estímulo. A correlação negativa do número de fetos com relação ao peso e ao comprimento fetal pode indicar que a limitação de espaço intra-uterino e abdominal materno contribui, de forma semelhante ao desenvolvimento das reabsorções fetais, para redução as medidas fetais. A variação

individual da curva de crescimento é, em parte, determinada pelo genoma fetal, mas também é influenciada por condições intra-uterinas que, para muitas espécies, incluem o tamanho da ninhada e a vantagem e desvantagem relativas representadas pelos diferentes locais dentro do útero. Uma velocidade normal de crescimento presume suprimentos adequados de nutrientes e oxigênio, e tal velocidade sofrerá uma queda se a circulação uterina estiver prejudicada, se houver tecido placentário sadio insuficiente ou se a mãe estiver gravemente desnutrida. Embora seja amplamente aceito que exista uma correlação inversa entre o tamanho da ninhada e o peso neonatal e fetal individual, o resultado, que em geral se torna evidente apenas próximo ao termo completo, é usualmente modesto quando outras condições são favoráveis e o tamanho da ninhada não é extremo. (DYCE, 2004).

Na maioria dos estudos experimentais, a artéria uterina é ligada entre o 14^o e o 16^o dias de gestação. Essa janela de tempo pode corresponder ao começo do terceiro trimestre da gestação em humanos (HOLEMANS *et al.*, 2003). Nessa fase ocorre a RCIU denominada assimétrica, em que o comprimento atinge seu valor esperado e há apenas redução do peso fetal. Ainda para essa classificação, outras medidas como os perímetros cefálico e abdominal são importantes para definir este diagnóstico (HADLOCK, 1996; CUNNINGHAM *et al.*, 2001). Entretanto, o perfil regulador do desenvolvimento de um específico sistema de órgãos em ratos pode diferir dos humanos (HOLEMANS *et al.*, 2003; FERNANDEZ-TWINN & OZANNE, 2006). As conseqüências pós-natais de um insulto durante a gestação parecem ser dependentes do tempo e da duração do insulto (MCCANCE & WIDDOWSON, 1974; WIDDOWSON & MCCANCE, 1963). Dessa forma, em nosso estudo a RCIU observada não pôde ser caracterizada como assimétrica, pois no momento em que foi feito o clampeamento ainda pode existir aumento do

comprimento fetal, e além disso, para a classificação do tipo de RCIU, seriam necessárias outras medidas.

Foi observado um comprimento fetal reduzido significativamente nos casos de interação entre o clampeamento e o estímulo. Entretanto, essa variação não foi observada nos casos com fio. Estes dados indicam que a associação da restrição do fluxo provocada pelo clampeamento e o estímulo são os fatores que mais influenciam no prejuízo para o desenvolvimento do comprimento fetal.

O peso das placentas no corno clampeado foi significativamente menor que o peso das placentas no corno contralateral ao clampeamento e no corno com fio. Esses dados demonstram que o clampeamento parece ser o maior responsável pela diminuição do peso placentário, estando de acordo com outro estudo, também utilizando o clampeamento artéria uterina em um dos cornos de ratas como modelo de insuficiência vascular, e o contralateral como controle (WIGGLESWORTH, 1964). O peso das placentas no corno contralateral ao clampeamento foi menor que o observado no corno contralateral ao fio evidenciando a interferência do clampeamento mesmo no corno contralateral. O corno com fio apresentou menor peso que seu contralateral, demonstrando uma possível interferência do estresse cirúrgico no peso placentário (OGATA *et al.*, 1986; WLODEK *et al.*, 2005). O volume placentário foi menor nos casos com clampeamento. Foram observadas diferenças entre a aplicação do clampeamento e do fio, mas sem alterações em relação aos contralaterais correspondentes. Estudos experimentais demonstram que a placenta é a primeira a sofrer as conseqüências da redução do fluxo sanguíneo, sendo evidenciadas pelo decréscimo em suas medidas, responsável pela redução da transferência de oxigênio e nutrientes e menor produção de fatores de crescimento (BOYD, 1984; LANG *et al.*, 2003). Dessa forma, a magnitude da redução da massa placentária pode refletir o grau de comprometimento do fluxo útero-placentário, influenciando tardiamente no peso fetal

(SALAFIA *et al.*, 1995; LANG *et al.*, 2003). Esses dados estão de acordo com nosso estudo, onde foram observadas alterações no peso e no volume placentário na maioria das intervenções realizadas, numa frequência maior que as alterações encontradas nos fetos.

Outros estudos demonstram que a restrição útero-placentária, associada a uma manutenção do peso placentário, possui uma tendência de aumento na área de superfície total e diâmetros da placenta, dependendo da intensidade da redução da perfusão e da função placentária. Em resposta à perfusão reduzida, os fatores que promovem o crescimento placentário aumentam numa tentativa de preservar sua função, como indicado pelo aumento no diâmetro placentário (REID *et al.*, 1999; WLODEK *et al.*, 2005). Esse mecanismo compensatório promove um fluxo sanguíneo uterino suficiente para proteger o feto da insuficiência placentária. Nossos dados demonstraram uma redução do volume placentário, semelhante ao que ocorreu com o peso da placenta, dados de acordo com outros estudos (MUGHAL *et al.*, 1989), sugerindo que a redução do peso placentário provocado pelo clampeamento não foi compensada pelo aumento dos diâmetros, e conseqüentemente, do volume placentário, talvez pelo curto período entre a realização do procedimento e a eutanásia das ratas.

A correlação negativa entre volume placentário e número de fetos pode ser explicada por mecanismos semelhantes ao que ocorre em relação às reabsorções e ao peso fetal (DYCE, 2004). Houve uma correlação positiva e significativa entre o peso fetal e placentário. Na literatura é descrita uma relação entre crescimento ou restrição do peso placentário e os outros órgãos fetais (WIGGLESWORTH, 1964). Sugere-se que a capacidade da placenta em transferir nutrientes e oxigênio é proporcional a seu tamanho, fator este que explicaria a correlação entre peso placentário e o peso fetal (DIAS *et al.*, 2001).

Houve uma correlação positiva entre o peso da placenta e o número de fetos, podendo ser explicada pela grande capacidade funcional placentária (REID *et al.*, 1999; WLODEK *et al.*, 2005), que estando em condições de manter suas medidas, e principalmente suas funções, conseguiria manter a estrutura fetal, evitando, por exemplo, o desenvolvimento de reabsorções.

Não houve diferença significativa da porcentagem do número de vasos placentários em relação aos procedimentos realizados. De forma geral, a hipóxia útero-placentária é relacionada a um aumento do número de vasos placentários com a finalidade de promover a difusão de oxigênio. Esta difusão ocorre de forma mais efetiva devido à ativação da angiogênese, estimulada por fatores de crescimento produzidos por macrófagos ou pelo trofoblasto em condições de hipóxia. A amplificação do leito capilar causa redução da resistência fetoplacentária ao fluxo sangüíneo, beneficiando o sistema cardiovascular fetal exposto a hipóxia (ALVAREZ *et al.*, 1972; BURTON, 1997). Com a manutenção da hipóxia placentária ocorre uma inversão do padrão de proliferação vascular. O maior comprometimento fetal e o desenvolvimento vilositário anormal levam à redução da extração de oxigênio pelo feto, resultando em hiperóxia placentária, reduzindo os estímulos para angiogênese e resultando em colapso dos capilares (BURTON, 1997). Em humanos, doenças comumente associadas ao baixo fluxo útero-placentário, como as síndromes hipertensivas da gestação, observa-se um aumento do número de vasos. No entanto, estudos recentes demonstram que as formas graves da doença cursam com redução do número de vasos (CORRÊA *et al.*, 2008). Portanto, uma hipótese pela não variação dos casos com clampeamento da artéria uterina, em relação aos demais grupos analisados neste estudo, é de que o clampeamento pode ter provocado uma redução de oferta de oxigênio grave o suficiente para interferir no desenvolvimento dos fetos e levar a hiperóxia placentária.

Neste estudo foram observadas redução dos valores do peso fetal e do comprimento fetal, sugerindo um possível diagnóstico de RCIU. Alterações no processo de angiogênese têm sido associadas com o desenvolvimento de gestações com a RCIU (TORRY *et al.*, 2004). Há uma diminuição significativa da densidade vascular das vilosidades em placentas com RCIU, sugerindo uma diminuição na angiogênese com ramificação (CHEN *et al.*, 2002). Outros estudos mostraram uma diminuição na área de superfície, no volume e no número de vilosidades terminais, assim como número reduzido de capilares no estroma de placentas com RCIU, comparadas com placentas de gestações normais (TEASDALE, 1984; JACKSON *et al.*, 1995; KREBS *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2002; MAYHEW *et al.*, 2003). Foi demonstrado que o VEGF pode funcionar como um fator angiogênico induzido pela hipóxia (SHWEIKI *et al.*, 1993). Ao contrário do VEGF, a baixa pressão de oxigênio resulta em inibição da expressão de PIGF (SHORE *et al.*, 1997). Em gestações normais, os níveis de PIGF aumentam durante o segundo trimestre e atingem um pico no começo do terceiro trimestre antes de cair para baixos níveis no parto (TORRY *et al.*, 1998). No desenvolvimento da vasculatura placentária, parece que existe um equilíbrio entre a pressão parcial de oxigênio intraplacentária, nos níveis de VEGF e PIGF, que regulam a mudança entre a angiogênese com ramificação e a angiogênese sem ramificação (SHERER & ABULAFIA, 2001). Sugere-se que a hipóxia útero-placentária de surgimento precoce na restrição do crescimento fetal causa uma mudança para predominância prematura de PIGF, resultando na diminuição na angiogênese com ramificação, falência da angiogênese sem ramificação dentro da vilosidade terminal, e distúrbios na taxa de crescimento do trofoblasto possivelmente por promover a apoptose (KHALIQ *et al.*, 1999).

De forma interessante, experimentos com camundongos mostraram que a inibição do VEGF-A pode induzir a RCIU no camundongo gestante, enquanto a perda de PIGF não provocaria este efeito (LUTTUN *et al.*, 2002; ODORISIO *et al.*, 2002; TORRY *et al.*,

2003; RUTLAND *et al.*, 2005). Entretanto, mais recentemente, uma diminuição nos níveis de PIGF mas não de VEGF no soro materno e umbilical foi notada em humanos com RCIU na hora do parto (WALLNER *et al.*, 2007). Neste estudo foi utilizado como marcador vascular o Fator VIII, que não diferencia entre vasos antigos e neoformados. Mais estudos são necessários, buscando marcadores de vasos em diferentes estágios, com a finalidade de determinar os reais efeitos dos procedimentos realizados nos vasos placentários, e ainda, se o comprometimento do peso e do comprimento fetal observados estão diretamente associados às alterações vasculares na placenta. Portanto, não podemos expandir nossas conclusões além dos dados que foram obtidos com a análise morfométrica e a imunomarcação pelo Fator VIII.

Os casos submetidos ao estímulo pela TENS apresentaram menor número de vasos nas vilosidades placentárias. Na literatura, não foram encontrados estudos avaliando os efeitos da TENS especificamente sobre o número de vasos e o desenvolvimento fetoplacentário. Entretanto, são crescentes os estudos a respeito dos efeitos da estimulação elétrica sobre a perfusão de tecidos isquêmicos.

Em uma pesquisa avaliando os efeitos da TENS sobre a perfusão colateral durante oclusão coronariana aguda, os pacientes foram tratados com TENS convencional em uma intensidade de estimulação máxima tolerável, sem ativação muscular, indicando um efeito agudo positivo da neuroestimulação elétrica no aumento da perfusão colateral, que alivia a isquemia do miocárdio (JESSURUN *et al.*, 1998; VRIES *et al.*, 2007). Outros estudos sugerem que os efeitos se devem à homogeneização da perfusão do miocárdio (HAUTVAST *et al.*, 1996) e a um aumento na velocidade do fluxo sanguíneo intracoronariano (CHAUHAN *et al.*, 1994; JESSURUN *et al.*, 1998). Outra explicação para o aumento do fluxo sanguíneo associado à estimulação elétrica é a excitação de

nervos periféricos, que pode induzir a liberação de substância P nas terminações nervosas sensoriais, e portanto, vasodilatação (CHEN *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, tem sido dada atenção aos efeitos da TENS sobre o Sistema Nervoso Autônomo, especialmente os efeitos da estimulação elétrica na circulação periférica através da estimulação dos nervos simpáticos (HOLLMAN & MORGAN, 1997). As pesquisas fornecem resultados variados, com alguns investigadores alegando que a estimulação elétrica aumenta o fluxo sanguíneo (WAKIM, 1953; ABRAM *et al.*, 1980; CHAN & CHOW, 1981; CURRIER *et al.*, 1986; LINDEROTH *et al.*, 1991), outros relatam redução do mesmo (ABRAM, 1976; WONG & JETTE, 1984; CASALE *et al.*, 1985), enquanto pesquisadores alegam que a estimulação elétrica não tem efeito na circulação (TRACY *et al.*, 1988).

Sugere-se que os parâmetros da TENS utilizados possam influenciar em seus efeitos sobre a perfusão tecidual. Em um estudo avaliando os efeitos da TENS sobre o fluxo sanguíneo cutâneo, os resultados indicam que a TENS de alta e baixa frequência não parecem ter os mesmos efeitos sobre o fluxo sanguíneo local. Autores demonstram que há um aumento do fluxo sanguíneo local associado à TENS de baixa frequência, que causa vasodilatação cutânea possivelmente como um resultado da inibição do sistema nervoso simpático, resultados não observados com a utilização da TENS de alta frequência (CRAMP *et al.*, 2000). Estudos anteriores mostram que a TENS de baixa frequência (4Hz), quando aplicada a um nervo periférico numa intensidade “forte, mas confortável”, aumenta o fluxo sanguíneo cutâneo local, comparada com uma aplicação de TENS de alta frequência ou a um grupo controle. Entretanto, tem sido sugerido que uma sensação subjetiva “forte, mas confortável” também pode ser produzida utilizando a TENS de alta frequência, em uma menor intensidade (BURTON & MAURER, 1974). Em nosso estudo foi utilizada a TENS de alta frequência e baixa intensidade, respeitando o limiar de

tolerância máxima sem ativação muscular. Devido às diversidades de parâmetros e suas respostas observadas em outros estudos, sugere-se uma maior investigação dos parâmetros da TENS, e sua possibilidade de melhora do fluxo sanguíneo.

Em humanos, a estimulação elétrica transcutânea lombo-sacral foi utilizada para aumentar a perfusão placentária de pacientes com diminuição do fluxo útero-placentário numa alta frequência entre 60 e 80 HZ e duração de pulso de 250 μ s. Em todos os casos, foi observado um aumento da perfusão placentária avaliada através do método de radioisótopos, concluindo que a estimulação nervosa elétrica transcutânea pode ser usada com propósito terapêutico nos casos de disfunção placentária (KUBISTA & PHILIPP, 1979; KUBISTA *et al.*, 1980). Entretanto, nosso estudo se baseou na avaliação do número de vasos placentários em um modelo experimental, demonstrando que a utilização da TENS reduz a porcentagem de vasos placentários.

Os efeitos da TENS sobre a perfusão tecidual ainda são contraditórios. Em nossos casos, o estímulo não aumentou o número de vasos placentários, e parece não ter uma contribuição benéfica sobre o desenvolvimento intra-uterino. Estudos que busquem avaliar a vasodilatação poderiam contribuir para elucidar os efeitos da TENS durante a gestação, embora a maioria dos resultados das análises feto-placentários tenha indicado uma repercussão negativa da TENS. Frente aos resultados obtidos, sugere-se que a TENS seja usada com cautela durante a gestação, pois seus parâmetros de utilização podem ter efeitos prejudiciais para o desenvolvimento intra-uterino.

Conclusão

Objetivo 1. Comparar o peso e o tamanho dos fetos e placentas em ratas com baixo fluxo sanguíneo uterino induzido experimentalmente, submetidas ou não à TENS;

Conclusão: A ligação da artéria uterina associada ao estímulo influencia no peso e comprimento fetais, assim como no peso e volume placentários, contribuindo para maior redução de suas medidas.

Objetivo 2. Comparar o número de vasos placentários em ratas com baixo fluxo sanguíneo uterino induzido experimentalmente, submetidas ou não à TENS;

Conclusão: O estímulo pela TENS, independente do clampeamento, reduz o número de vasos placentários.

Portanto, os efeitos da TENS sobre a perfusão tecidual ainda permanecem contraditórios. Foi demonstrada uma redução do número de vasos nas placentas das ratas estimuladas. Embora tolerável para os animais, o estímulo parece não ter sido benéfico para melhora da perfusão através do aumento do número de vasos placentários, como é citado em outros trabalhos que descrevem os efeitos benéficos da TENS sobre a perfusão tecidual. Além disso, nos casos submetidos à TENS houve comprometimento do desenvolvimento feto-placentário. Dessa forma, mais estudos são necessários para que sejam estabelecidos os mecanismos de atuação da TENS, e sugere-se cautela quanto a seu uso durante a gestação.

Referências

1. ABRAM SE. Increased sympathetic tone associated with transcutaneous electrical stimulation. **Anesthesiology** 1976; 45:575-577.
2. ABRAM SE, ASIDDAO CB, REYNOLDS AC. Increased skin temperature during transcutaneous electrical stimulation. **Anesth Anal** 1980; 59:22-25.
3. ALVAREZ H *et al.* Trophoblast development gradient and its relationship to placental hemodynamics. II. Study of fetal cotyledons from the toxemic placenta. **Am J Obstet Gynecol** 1972; 114(7):873-878.
4. ASSHETON R. The morphology of the ungulate placenta, particularly the development of that organ in sheep, and notes upon the placenta of the elephant and hyrax. **Phil Trans R Soc Lond Ser B** 1906; 198:143–200.
5. BARCROFT J. Researches in Pre-Natal Life. **Oxford: Blackwell Scientific** 1946.
6. BASSINGTHWAIGHTE JB, GORESKY CA. Modeling in the analysis of solute and water exchange in the microvasculature. In *Handbook of Physiology*, section 2, *The Cardiovascular System*, vol IV, *Microcirculation*, ed. Renkin EM & Michel CC. Bethesda, MD, USA. **American Physiological Society** 1984; 549–626.
7. BITAR RE. Crescimento intra-uterino retardado. In: Zugaib M, editor. **Medicina fetal** 2a ed. São Paulo: Atheneu 1998; 358-376.

8. BLANC WA. Experimental fetal growth retardation. **Pediat Res** 1976; 1:218.
9. BOYD PA. Quantitative structure of the normal human placenta from 10 weeks of gestation to term. **Early Human Development** 1984; 9:297-307.
10. BREIER G, DAMERT A, PLATE KH, RISAU W. Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. **Thromb Haemostasis** 1997; 78:678-683.
11. BURTON GJ. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. **Placenta** 1997; 18:625-626.
12. BURTON C, MAURER DD. Pain suppression by transcutaneous electronic stimulation. **IEEE Trans Biomed Eng** 1974; 21:81-88.
13. CALDERON IMP, RUDGE MVC, DELGI MR, PERAÇOLI JC. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico, de placentas de ratas diabéticas: relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intra-uterino. **RBGO** 1999; 21(2): 91-98.
14. CASALE R, GIBELLINI R, BOZZI M, BONELLI S. Changes in sympathetic activity during high frequency TENS. **Acupunt Electro-Ther Res Int J** 1985; 10:169-175.

15. CHAN CS, CHOW SP. Electro-acupuncture in the treatment post-traumatic sympathetic dystrophy (Sudeck's atrophy). **Br J Anaesth** 1981; 53:899-902.
16. CHAUHAN A, MULLINS PA, THURAISSINGHAM SI, TAYLOR G, PETCH MC, SCHOFIELD PM: Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on coronary blood flow. **Circulation** 1994; 89:694-702
17. CHEN CP, BAJORIA R, APLIN JD. Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intra-uterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. **Am J Obstet Gynecol** 2002; 187:764-769.
18. CHEN JQ, YONEHARA N, IMAI Y, INOKI R. Effects of morphine on cutaneous blood flow and substance P release evoked by electrical stimulation on rat sciatic nerve. **Acta Pharmacol Sin** 1991; 12:355-357.
19. CICOGNANI A, ALESSANDRONI R, PASINI A, PIRAZZOLI P, CÁSSIO A, BARBIERI E, *et al.* Low birth weight for gestational age and subsequent male gonadal function. **J Pediatr** 2002; 141:376-379.
20. CLEMENT DL, SHEPHERD JT. Regulation of peripheral circulation during muscular exercise. **Prog Cardiovasc Dis** 1976; 19:23-31.

21. COOK, M J. The Anatomy of the Laboratory Mouse. Disponível em: <http://www.informatics.jax.org/cookbook/chapters/contents2.shtml>. Acesso em: 01 set. 2006.
22. CORRÊA RRM, GILIO DB, CAVELLANI CL, PASCHOINI MC, OLIVEIRA FA, PERES LC, REIS MA, TEIXEIRA VPA, CASTRO ECC. Placental morphometrical and histopathology changes in the different clinical presentations of hypertensive syndromes in pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics** 2008; 277:201-206.
23. CRAMP AFL, GILSENAN C, LOWE AS, WALSH DM. The effect of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation upon cutaneous blood flow and skin temperature in healthy subjects. **Clinical Physiology** 2000; 20(2):150-157.
24. CUNNINGHAM FG, GANT N, LEVENO KJ, GILSTRAP III LC, AUT, JC, WENSTROM KD. Williams obstetrics 21st ed. New York: McGraw-Hill 2001.
25. CURRIER DP, PETRILLI CR, THRELKELD AJ. Effect of graded electrical stimulation on blood flow to healthy muscle. **Phys Ther** 1986; 66:937-943.
26. DAIKOKU NH, JOHNSON JW, GRAF C, KEARNEY K, TYSON JE, KING TM. Patterns of intrauterine growth retardation. **Obstet Gynecol** 1979; 54(2):211-219.

27. DEL NERO U, RUDGE MVC, NOVO NF, CALDERON IMP, BRASIL MAM. Metodologia para estudo do volume e densidade absoluta da placenta humana de termo. **RBGO** 2002; 24(10):669-673.
28. DEMIR R, SEVAL Y, HUPPERTZ B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. **Acta Histochem** 2007; 109:257-265.
29. DIAS R, RUDGE MVC, TRINDADE JCS. Hipertensão arterial experimental e prenhez em ratas: repercussões no peso da placenta e no índice placentário. **RBGO** 2001; 23(02):87-91.
30. DOOLEY DM, KRASPAK M. Modification of blood flow to the extremities by electrical stimulation of the nervous system. **South Med j** 1976; 69:1309-1311.
31. DYCE KM, SACK WO, WENSING CJG. Tratado de anatomia veterinária. 3.ed. Rio de Janeiro : Elsevier. 2004; 196.
32. FABER JJ, THORNBURG KL. Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange. New York: Raven Press 1983.
33. FAROUK SADIQ H, DAS UG, TRACY TF, DEVASKAR SU. Intra-uterine growth restriction differentially regulates perinatal brain and skeletal muscle glucose transporters. **Brain Res** 1999; 823: 96-103.

34. FERNANDEZ-TWINN DS, OZANNE SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. **Physiol Behav** 2006; 88:234-243.
35. FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev** 1997; 18:4-25.
36. FERREIRA CHJ, NAKANO AMS, BUENO JV, SANCHES MLGT. O uso da eletroestimulação nervosa transcutânea como recurso de alívio de dor no trabalho de parto em um contexto de humanização da assistência obstétrica. **Fisioterapia Brasil** 2004; 5:307-311.
37. FERREIRA CHJ, PAYNO SMA. Eletroestimulação nervosa transcutânea como recurso de alívio da dor no trabalho de parto. **Femina** 2002; 30(2):83-86.
38. FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. Angiogenic factors. **Science** 1987; 233:442-447.
39. FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. **J Biol Chem** 1992; 267(16):10931–10934.
40. GENTZ BA. Alternative therapies for the management of pain in labor and delivery. **Clin Obstet Gynecol** 2001; 44:704-32.

41. GREISS FC, ANDERSON SG. Uterine blood flow during early ovine pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 1970; 106:30.
42. GRUENWALD P. Chronic Fetal distress and placental insufficiency. **Biol Neonate** 1963; 5:215-265.
43. GRUENWALD P. Growth of the human fetus. I. Normal growth and its variation. **Am J Obstet Gynecol** 1966; 94(8):1112-1119.
44. GUIRRO E, GUIRRO R. Eletroterapia. In: Guirro E. Guirro R. Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos e patologias. 3a.ed. São Paulo: Manole 2004; 107-174.
45. HADLOCK FP. Avaliação ultra-sonográfica do crescimento fetal. In: Callen P, editor. Ultrasonografia em obstetrícia e ginecologia. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1996; 124-138.
46. HANAHAN D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science** 1997; 277:48-50.
47. HAUTVAST RW, BLANKSMA PK, DE JONGSTE MJ, PRUIM J, VAN DER WALL EE, VAALBURG W, LIE KI. Effect of spinal cord stimulation on myocardial blood flow assessed by positron emission tomography in patients with refractory angina pectoris. **Am J Cardiol** 1996; 77:462-467.

48. HOHENAUER L, OH W. Body composition in experimental intrauterine growth retardation in the rat. **J Nutr** 1969; 99:23-26.
49. HOLEMANS K, AERTS L, VAN ASSCHE FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. **J Soc Gynecol Investig** 2003; 10:392-399.
50. HOLLMAN JE, MORGAN BJ. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on the pressor response to static handgrip exercise. **Phys Ther** 1997; 77:28-36.
51. JACKSON MR, WALSH AJ, MORROW RJ, MULLEN JB, LYE SJ, RITCHIE JWK. Reduced placental villous tree elaboration in small-for-gestational-age pregnancies: relationship with umbilical artery Doppler waveforms. **Am J Obstet Gynecol** 1995; 172(2):518-525.
52. JESSURUN GA, TIO RA, DE JONGSTE MJ, HATVAST RW, DEN HEIJER P, CRIJNS HJ:coronary blood flow dynamics during transcutaneous electrical nerve stimulation for stable angina pectoris associated with severe narrowing of one major coronary artery. **Am J Cardiol** 1998; 82:921-926.
53. JOHNSON, M. Estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS). In: Kitchen S. Eletroterapia: prática baseada em evidências. 2. ed. Manole: São Paulo 2003; 259-285.

54. JOHNSON MI. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in the management of labour pain: the experience of over ten thousand women. **British Journal of Midwifery** 1997; 5:400-405.
55. KAPLAN B, RABINERSON D, PARDO J, KRIESER RU, NERI A. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) as a pain-relief device in obstetrics and gynecology. **Clin Exp Obstet Gynecol** 1997; 24:123-126.
56. KAUFMANN P, MAYHEW TM, CHARNOCK-JONES DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. **Placenta** 2004; 25:114–126.
57. KHALIQ A, LI XF, SHAMS M, SISI P, ACEVEDO CA, WHITTLE MJ, WEICH H, AHMED A Localization of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. **Growth Factors** 1996; 13:243–250.
58. KLAGSBRUN M, D'AMORE PA. Regulators of angiogenesis. **Annu Rev Physiol** 1991; 53:217.
59. KREBS C, MACARA LM, LEISER R, BOWMAN AW, GREER IA, KINGDOM JCP. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. **Am J Obstet Gynecol** 1996; 175:1534–1542.

60. KUBISTA E. The influence of transcutaneous nerve stimulation (TNS) on hormonal parameters of placental function in cases of placental insufficiency. **Z Geburtshilfe Perinatol** 1981; 185(3):151-154.
61. KUBISTA E, PHILIPP K. The influence of TNS (transcutaneous nerve stimulation) on placental flow. **Z Geburtshilfe Perinatol** 1979; 183(1):30-34.
62. KUBISTA E, PHILIPP K, BOSCHITSCH E. Improvement of utero-placental perfusion by transcutaneous nerve stimulation. **Wien Med Wochenschr** 1980; 30,130(18):595-597.
63. LAMPE GE. Estimulação elétrica nervosa transcutânea. In: O'Sullivan SB. *Fisioterapia: avaliação e tratamento*. 2a ed. São Paulo: Manole 1993; 739-760.
64. LANE RH, FLOZAK AS, OGATA ES, BELL GI, SIMMONS RA. Altered hepatic gene expression of enzymes involved in energy metabolism in the growth retarded fetal rat. **Pediatr Res** 1996; 39:390-394.
65. LANG U, BAKER RS, KHOURY J, CLARK KE. Effects of chronic reduction in uterine blood flow on fetal and placental growth in the sheep. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2000; 279(1):53-59.
66. LANG U *et al.* Uterine blood flow – a determinant of fetal growth. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2003; 110:55-61.

67. LIEBANO RE, FERREIRA LM, SABINO NETO, M. Modelo experimental para estimulação elétrica nervosa transcutânea em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. **Acta Cir. Bras** 2003; 18:54-59.
68. LIN CC, EVANS MI. Intrauterine growth retardation: pathophysiology and clinical management. New York: Mc Graw Book Co 1984.
69. LINDEROTH B, GUNASKERA L, MEYERSON BA. Effects of sympathectomy on skin and muscle microcirculation during dorsal column stimulation: animal studies. **Neurosurgery** 1991; 29:874-879.
70. LUTTUN A, BRUSSELMANS K, FUKAO H, TJWA M, UESHIMA S, HERBERT JM, MATSUO O, COLLEN D, CARMELIET P, MOONS L. Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 295(2):428-434.
71. MAGNESS RR. Maternal cardiovascular and other physiological responses to the endocrinology of pregnancy. In: Bazer FW (ed.), *The Endocrinology of Pregnancy*. Totowa, NJ: **Humana Press** 1998; 507–539.
72. MARCONDES, FK, BIANCHI, FJ, TANNO, AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol** 2002; 62(4A): 609-614.

73. MAYHEW TM, OHADIKE C, BAKER PN, CROCKER IP, MITCHELL C, ONG SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. **Placenta** 2003; 24:219–226.
74. MCCANCE RA, WIDDOWSON EM: The determinants of growth and form. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 1974; 185:1-17.
75. MELZACK R, WALL PD. Pain mechanisms: a new theory. **Science** 1965; 150(699):971-979.
76. MESCHIA G. Circulation to female reproductive organs. In: Shepherd JT, Abboud FM (eds.), *Handbook of Physiology*, section 2, vol. III, part 1. Bethesda, MD: **American Physiological Society** 1983; 241–269.
77. MUGHAL MZ, ROSS R, TSANG RC. Clearance of calcium across in situ perfused placentas of intrauterine growth-retarded rat fetuses. **Pediatr Res** 1989; 25: 420–422.
78. NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J** 1999; 13:9–22.
79. NIH: The US National Institute of Health. *Guide for the care and use of laboratory animals* 1996; 85-23.

80. NÜSKEN KD, DÖTSCH J, RAUH M, RASCHER W, SCHNEIDER H. Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. **Endocrinology** 2008; 149(3):1056-1063.
81. ODORISIO T, SCHIETROMA C, ZACCARIA ML, CIANFARANI F, TIVERON C, TATANGELO L, FAILLA CM, ZAMBRUNO G. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. **J Cell Sci.** 2002; 115(12):2559-2567.
82. OGATA ES, BUSSEY ME, FINLEY S. Altered gas exchange, limited glucose and branched chain amino acids, and hypoinsulinism retard fetal growth in the rat. **Metabolism** 1986; 35:970–977.
83. OGATA ES, SWANSON SL, COLLINS JW JR, FINLEY SL. Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat. **Pediatr Res** 1990; 27:56-63.
84. PARDI G, CETIN I, MARCONI AM, LANFRANCHI A, BOZZETTI P, FERRAZZI E, BUSCAGLIA M, BATTAGLIA FC. Diagnostic value of blood sampling in fetuses with growth retardation. **N Engl J Med** 1993; 328:692-696.

85. PAULO ICAL, PAULO DNS, CINTRA LC, SANTOS MCS, RODRIGUES H, FERRARI TA, AZEVEDO TCV, SILVA AL. Cirurgia conservadora do baço e oxigenoterapia hiperbárica. **Acta Cirúrgica Brasileira** 2007; 22(1):21-28.
86. POPE G, MOCKETT S, WRIGHT J. A survey of electrotherapeutic modalities: Ownership and use in the NHS in England. **Physiotherapy** 1995; 81:82-91.
87. RAJAKUMAR PA, JING H, SIMMONS RA, AND DEVASKAR SU. Effect of uteroplacental insufficiency upon brain neuropeptide Y and corticotropin releasing factor gene expression and concentrations. **Pediatr Res** 1998; 44:168-174.
88. RAMSEY EM. The Placenta, Human and Animal. New York: Praeger 1982.
89. REEVE J, MENON D, CORABIAN P. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS): a technology assessment. **International Journal of Technology Assessment Health Care** 1996; 12:299-324.
90. REICHENHEIM ME, MORAES CL. Pillars for assessing validity in epidemiological studies. **Rev bras epidemiol** 1998; 1:2.
91. REID GJ, LANE RH, FLOZAK AS, SIMMONS RA. Placental expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in growth-restricted fetal rats. **Am J Obstet Gynecol** 1999; 180:1017-1023.

92. REYNOLDS LP. Utero-ovarian interactions during early pregnancy: role of conceptus-induced vasodilation. **J Anim Sci** 1986; 62(2):47-61.
93. REYNOLDS LP, BOROWICZ PP, VONNAHME KA, JOHNSON ML, GRAZUL-BILSKA AT, REDMER DA, CATON JS. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. **J Physiol** 2005; 565:43-58.
94. REYNOLDS LP, MAGNESS RR, FORD SP. Uterine blood flow during early pregnancy in ewes: Interaction between the conceptus and the ovary bearing the corpus luteum. **J Anim Sci** 1984; 58:423-429.
95. REYNOLDS LP, KILLILEA SD, REDMER DA. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB J** 1992; 6:886-892.
96. REYNOLDS LP, REDMER DA. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. **Biol Reprod** 1992; 47:698-708.
97. REYNOLDS LP, REDMER DA. Utero-placental vascular development and placental function. **J Anim Sci** 1995; 73:1839-1851.

98. REYNOLDS LP, REDMER, DA. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction** 2001; 64:1033-1040.
99. RISAU W, FLAMME I. Vasculogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 1995; 11:73-91.
100. ROBERTSON V, SPURRITT D. Electrophysical agents: Implications of their availability and use in undergraduate clinical placements. **Physiotherapy** 1998; 84:335-344.
101. RUSHTON DN. Electrical stimulation in the treatment of pain. **Ann Disability and Rehabilitation** 2002; 24(8):407-415.
102. RUTLAND CS, MUKHOPADHYAY M, UNDERWOOD S, CLYDE N, MAYHEW TM, MITCHELL CA. Induction of intrauterine growth restriction by reducing placental vascular growth with the angioinhibin TNP-470. **Biol Reprod** 2005; 73(6):1164-1173.
103. SALAFIA CM *et al.* Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: associated placental pathologic features. **Am J Obstet Gynecol** 1995; 173(4):1049-1057.
104. SCHWARTZ NB. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. **Am J Physiol** 1964; 107:1251-1259.
105. SHERER DM, ABULAFIA O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. **Placenta** 2001; 22:1-13.

106. SHORE VH, WANG TH, WANG CL, TORRY RJ, CAUDLE MR, TORRY DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. **Placenta** 1997; 18:657-665.
107. SHWEIKI D, ITIN A, NEUFELD G, GITAY-GOREN H, KESHET E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonal regulated angiogenesis. **J Clin Invest** 1993; 91:2235–2243.
108. STARKEY C. Recursos terapêuticos em fisioterapia. 1a ed. Manole, São Paulo 2001; 380-382.
109. TEASDALE F. Idiopathic intrauterine growth retardation: histomorphometry of the human placenta. **Placenta** 1984; 5(1):83-92.
110. TENOVUO A, KERO P, PIEKKALA P, KORVENRANTAH, ERKKOLA R. Fetal and neonatal, mortality of small-for-gestational age infants. **Eur J Pediatr** 1988; 147:613-615.
111. TORRY DS, HINRICHS M, TORRY RJ. Determinants of placental vascularity. **Am J Reprod Immunol** 2004; 51:257-268.

112. TORRY DS, MUKHERJEA D, ARROYO J, TORRY RJ. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. **J Soc Gynecol Investig** 2003; 10:178-188.
113. TORRY DS, WANG HS, WANG TH, CAUDLE MR, TORRY RJ. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. **Am J Obstet Gynecol** 1998; 179:1539-1544.
114. TRACY JE, CURRIER DP, THRELKELD AJ. Comparison of selected pulse frequencies from two different electrical stimulators on blood flow in healthy subjects. **Phys Ther** 1988; 68:1526-1532.
115. TRUDINGER BJ, GILES WB, AND COOK CM. Uteroplacental blood flow velocity-time waveforms in normal and complicated pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol** 1985; 92:39-45.
116. VRIES J, ANTHONIO RL, DEJONGSTE MJL, JESSURUN GA, TAN E, SMET BJGL, VAN DEN HEUVEL AFM, STALL M, ZIJLSTRA F. The effect of electrical neurostimulation on collateral perfusion during acute coronary occlusion. **BMC Cardiovascular Disorders** 2007; 7:18.
117. WADSWORTH H, CHANMUGAN APP. *Electrophysical Agents In Physiotherapy*, 2nd, Marrickville, NSW **Australian Science Press** 1980.

118. WAKIM KG. Influence of frequency of muscle stimulation on circulation in the stimulated extremity. **Arch Phys Med rehab** 1953; 34:291-295.
119. WALLNER W, SENGENBERGER R, STRICK R, STRISSEL PL, MEURER B, BECKMANN MW, SCHLEMBACH D. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. **Clin Sci (Lond)** 2007; 112(1):51-57.
120. WALTON A, HAMMOND J. The maternal effects on growth and conformation in Shire horse – Shetland pony crosses. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 1938; 125:311-335.
121. WIDDOWSON EM, MCCANCE RA. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 1963; 185:329-342.
122. WIGGLESWORTH JS. Experimental growth retardation in foetal rat. **J Pathol Bacteriol** 1964; 88:1-13.
123. WIGGLESWORTH JS. Animal model of growth retardation. **Am J Pathol** 1974; 77:374-350.
124. WILLIAMS MA. Quantitative methods in biology. Amsterdam: Elsevier/North-Holland **Biomedical Press** 1977; 233.

125. WLODEK ME, WESTCOTT KT, O'DOWD R, SERRUTO A, WASSEF L, MORITZ KM, MOSELEY JM. Uteroplacental restriction in the rat impairs fetal growth in association with alterations in placental growth factors including PTHrP. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 2005; 288:1620-1627.
126. WONG RA, JETTE DU. Changes in sympathetic tone associated with different forms of transcutaneous electrical nerve stimulation in healthy subjects. **Phys Ther** 1984; 64:478-482.
127. YOUNG WC, BOLING JL, BLANDAU R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. **Anat Rec** 1941; 80:37-45.