MARCELO GRAZIANO CUSTÓDIO

**Análise morfológica renal
de ratas prenhes submetidas
ao estresse**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Dr. Nilton Hideto Takiuti

**São Paulo
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Custódio, Marcelo Graziano

Análise morfológica renal de ratas prenhes submetidas ao estresse / Marcelo
Graziano Custódio. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Nilton Hideto Takiuti.

Descritores: 1.Prenhez 2.Estresse 3.Rim/anatomia & histologia 4.Ratos
5.Imobilização

USP/FM/SBD-189/06

Dedicatória

A **Deus**, por tudo o que somos.

Aos meus pais, **Antônio Francisco Custódio e Iraci Graziano Custódio**,
pelo amor e confiança em mim depositados.

À minha família, **Carlo, Marco Antônio, Maurício, Ana, Kete e Karen**,
companheiros leais de todas as horas.

Agradecimento Especial

Ao Dr. Nilton Hideto Takiuti e à Dra. Denise Maria Avancini Costa

Malheiros, pelo incentivo, amizade e cuidado pelo ensino.

Agradecimentos

Ao **Professor Dr. Marcelo Zugaib**, pela oportunidade de realizar a presente dissertação de Mestrado.

Ao **Professor Dr. Victor Bunduki e Dra. Maria de Lourdes Brizot**, cujos comentários e sugestões durante a qualificação muito contribuíram para o resultado final deste trabalho.

Ao **Professor Dr. Roberto Eduardo Bittar**, pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de profissionalismo.

À **Doutora Rossana Pulcinelli Vieira Francisco**, pela confiança em meu trabalho.

Aos amigos **Alexandre, André e Fernanda**, pela compreensão e apoio durante a realização deste trabalho.

Às senhoras **Salet Teresinha, Isis, Inês, Soraia, Márcia, Fátima, Marina**, aos senhores **Alan e Ricardo** e demais funcionários da Clínica Obstétrica, pela ajuda nas mais diferentes e adversas situações.

A todos os médicos assistentes, residentes e colegas pós-graduandos da Clínica Obstétrica, pela convivência prazerosa e pelo coleguismo demonstrados.

Sumário

Lista de siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O estresse	02
1.2. Estresse e gestação	03
1.3. Estresse e pré-eclâmpsia	04
1.4. Rins e pré-eclâmpsia	09
1.5. Modelos animais de pré-eclâmpsia	12
1.5.1. Isquemia útero-placentária experimental	13
1.5.2. Manipulação da síntese de prostaglandinas e óxido nítrico	14
1.5.3. Manipulação de dietas	15
1.5.4. Exposição ao frio	16
1.5.5. Exposição ao estresse sônico e superpopulação	17
1.6. Modelos de pré-eclâmpsia em ratos	18
2. PROPOSIÇÃO	21
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1. Material	25
3.2. Operacionalização dos experimentos	25
3.2.1. Acasalamento dos animais	26
3.3 Experimentos	26
3.3.1. Determinação dos grupos	26
3.3.2. Tratamento estressante crônico e agudo	28
3.3.3. Sacrifício dos animais	31
3.4. Parâmetros avaliados durante os experimentos	31
3.4.1. Determinação do peso dos animais	31
3.4.2. Determinação da pressão arterial caudal dos animais	32
3.4.3. Determinação dos pesos das placentas e fetos	33
3.4.4. Coleta dos rins	34
3.4.5. Avaliação dos rins à microscopia óptica	34
3.5. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Avaliação renal	37
4.2. Repercussão do estímulo estressante sobre os parâmetros maternos	40

4.2.1. Avaliação do peso dos animais	41
4.2.2. Avaliação da pressão arterial caudal dos animais	47
4.3. Repercussão do estímulo estressante sobre os parâmetros feto-placentários	49
4.3.1. Avaliação do peso dos fetos e das placentas .	49
4.4. Análise de modelo de restrição do crescimento intra-uterino em ratas prenhes submetidas ao estresse	50
5. DISCUSSÃO	51
5.1. Avaliação renal	53
5.2. Peso	56
5.3. Ganho de peso e estresse	57
5.4. Pressão arterial	58
5.5. Imobilização e estresse em ratos	60
5.6. Repercussões fetais	62
5.7. Considerações sobre o modelo	67
5.8. Considerações finais	71
6. CONCLUSÕES	72
7. ANEXOS	74
8. REFERÊNCIAS	83

Listas

LISTA DE SIGLAS

G	ganho de peso
GA	ganho de peso no período de aclimatação
G1	ganho de peso do início ao sétimo dia do experimento
G2	ganho de peso do sétimo ao décimo quarto dia do experimento
G3	ganho de peso do décimo quarto ao vigésimo dia do experimento
GT	ganho de peso do início ao final do experimento
LIM	Laboratório de Investigação Médica
P	peso
PIA	peso no início do período de aclimatação
P1	peso no início do experimento
P2	peso no sétimo dia do experimento
P3	peso no décimo quarto dia do experimento
P4	peso no vigésimo dia do experimento
PAS	pressão arterial caudal sistólica
PAD	pressão arterial caudal diastólica
PAM	média das pressões arteriais caudais sistólica e diastólica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rim de rata do grupo não prenhe controle. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X). 38

Figura 2 – Rim de rata do grupo não prenhe estresse. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X). 38

Figura 3 – Rim de rata do grupo prenhe controle. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X). 39

Figura 4 – Rim de rata do grupo prenhe estresse. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X). 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (PIA = início do período de aclimatação). 41

Tabela 2 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P1 = início do experimento – 1º dia). 41

Tabela 3 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P2 = início do estímulo, ou período equivalente – 7º dia). 42

Tabela 4 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P3 = final do estímulo, ou período equivalente – 14º dia). 42

Tabela 5 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P4 = final do experimento – 20º dia). 43

Tabela 6 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (GA = período de aclimatação). 44

Tabela 7 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (G1 = do início do experimento ao início do estímulo, ou período equivalente – 1º ao 7º dia). 44

Tabela 8 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (G2 = do início ao final do estímulo, ou período equivalente – 7º ao 14º dia). 45

Tabela 9 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (G3 = do final do estímulo ao final do experimento, ou período equivalente – 14º ao 20º dia).45

Tabela 10 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (GT = ganho de peso durante o experimento, exceto período de aclimação). 46

Tabela 11 – Médias das medidas de pressão arterial caudal de cada grupo no quinto dia da prenhez ou período equivalente $\pm$ desvio padrão em mmHg (PAS = pressão arterial caudal sistólica; PAD = pressão arterial caudal diastólica; PAM = média das pressões arteriais caudais sistólica e diastólica; 1 = medida no 5º dia do experimento). 47

Tabela 12 – Médias das medidas de pressão arterial caudal de cada grupo no décimo-oitavo dia da prenhez ou período equivalente $\pm$ desvio padrão em mmHg (PAS = pressão arterial caudal sistólica; PAD = pressão arterial caudal diastólica; PAM = média das pressões arteriais caudais sistólica e diastólica; 2 = medida no 18º dia do experimento). 48

Tabela 13 – Médias de pesos em gramas dos fetos e placentas de cada grupo $\pm$ desvio padrão ao final do experimento – 20º dia e número médio de fetos por prenhez por rata em cada grupo. 49

Tabela 14 – Comparação do número de fetos com peso abaixo dos percentis 3, 5 e 10 (calculados a partir do grupo controle para 20 dias de prenhez) entre os grupos prenhe controle e prenhe estresse. ... 50

Resumo

Custódio MG. **Análise morfológica renal de ratas prenhes submetidas ao estresse** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

O presente trabalho avaliou os rins de ratas Wistar prenhes e não prenhes submetidas ao estresse e seus respectivos controles. O estresse crônico consistiu de estímulo sônico de 100 decibéis por trinta minutos, interrompido por noventa minutos, e superpopulação entre o sétimo e o décimo quarto dia de gestação e o estresse agudo foi representado pela imobilização durante trinta minutos, no décimo oitavo dia da prenhez ou período equivalente nas ratas não prenhes, dois dias antes do final do experimento. Todas as ratas foram sacrificadas no vigésimo dia do protocolo. Foram avaliados os rins de todas as ratas do estudo, assim como o peso das ratas no primeiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo dia do experimento, a pressão arterial caudal no quinto e décimo oitavo dia de prenhez, ou período equivalente, e os pesos dos fetos e respectivas placentas. Não foram encontradas alterações à microscopia óptica nos rins das ratas submetidas ao estresse; entretanto foram observadas maiores medidas de pressão arterial caudal sistólica ($154,4 \pm 14,2$ mmHg) e diastólica ($89,0 \pm 8,7$ mmHg) no grupo prenhe estresse ($p < 0,05$) em relação ao grupo prenhe controle ($129,1 \pm 13,1$ mmHg e $79,9 \pm 18,1$ mmHg, respectivamente) no décimo oitavo dia e menor peso dos fetos ($2,54 \pm 0,32$ g) e das placentas ($0,53 \pm 0,09$ g) de ratas submetidas ao estresse crônico no vigésimo dia de prenhez ($p < 0,001$) quando comparados aos do grupo controle ($2,95 \pm 0,53$ g e $0,60 \pm 0,08$ g, respectivamente). Desta maneira, o modelo analisado pode ser empregado para avaliar a restrição do crescimento intra-uterino de ratos causada pelo estresse crônico, provavelmente decorrente do aumento dos níveis pressóricos maternos durante a prenhez.

Descritores: 1. Prenhez 2. Estresse 3. Rim/anatomia & histologia 4. Ratos 5. Imobilização

Summary

Custódio MG. **Renal morphological analysis of pregnant rats submitted to stress.** [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

This study evaluated the kidneys from pregnant and non-pregnant Wistar rats exposed to chronic stress and its respective control groups. The chronic stress consisted of noise exposure (30 minutes of 100-dB each two hours interval) and super-population between the 7th and 14th day and the acute stress of thirty minutes immobilization in the 18th of pregnancy two days before the end of the experiment. All the rats were killed in the 20th day of protocol. The kidneys were studied and also the weight of the rats in the 1st, 7th, 14th and 20th day, the caudal artery blood pressure in the 5th and 18th day, and the fetus and placentas weight. There were not seen any alteration using light microscopy in the kidney of rats submitted to stress; although it was observed a significant increase in systolic (154.4 ± 14.2 mmHg) and diastolic (89.0 ± 8.7 mmHg) caudal blood pressure in the 18th day in the pregnant stress group ($p < 0.05$) in relation to the control group (129.1 ± 13.1 mmHg and 79.9 ± 18.1 mmHg, respectively) and a decrease in fetal (2.54 ± 0.32 g) and placenta (0.53 ± 0.09 g) weight in the 20th day in the pregnant stress group ($p < 0.001$) in relation to the control group (2.95 ± 0.53 g and 0.60 ± 0.08 g, respectively). The analyzed model may be employed to evaluate the intrauterine growth restriction in rats, caused by chronic stress, probably induced by hypertension during the pregnancy.

Descriptors: 1. Pregnancy 2. Stress 3. Kidney/anatomy & histology 4. Rats 5. Immobilization

1 Introdução

A influência negativa do estresse sobre a gestação já é largamente conhecida, estando este correlacionado a processos patológicos específicos da gestação, como pré-eclâmpsia (Rofe e Goldberg, 1983; Klebanoff et al., 1990; Eskenazi et al., 1991; Saurel-Cubizolles et al., 1991; Landsbergis e Hatch, 1996; Klonoff-Cohen et al., 1996; Wergeland e Strand, 1997; Kobashi, 2006), restrição do crescimento fetal (Pagel et al., 1990; Brandt e Nielsen, 1992; Hedegaard et al, 1996-1996A; Rondó et al., 2003; Engel et al., 2005) e prematuridade (Schwartz, 1977; Berkowitz e Kasl, 1983; Heaman et al., 2005).

1.1. O estresse

O termo estresse ganhou vulto frente às repercussões que tem causado no dia a dia das pessoas, sejam elas homens, mulheres, crianças, idosos ou gestantes (Nandi et al, 2004). Sua interferência se dá, por exemplo, no cotidiano, no trabalho, na vida familiar, no relacionamento com amigos e suas conseqüências são vistas, com freqüência, como agentes causais de alterações que afetam diretamente o ritmo de vida dos diversos indivíduos constituintes da sociedade moderna (Godfrey e Julien, 2005). As relações inter-pessoais (Fraley et al., 2006), a produtividade (Burton et al., 2005), o

grau de satisfação e a disposição (Fujino et al., 2005) são fatores alterados de maneira direta por um estímulo estressante, qualquer que seja este, e na maior parte das vezes de modo prejudicial. Durante sua vida, a mulher encontra-se exposta às mazelas causadas pelo estresse (Hildingh et al., 2006).

As repercussões de um estímulo estressante são variáveis, algumas vezes imprevisíveis e difíceis de serem aferidas, quantificadas e analisadas (Cushway et al. 1996), uma vez que dependem do tipo de estímulo, de sua intensidade e de sua percepção, extremamente influenciada pelos valores morais e pela organização sócio-econômica do contexto onde o indivíduo se encontra inserido (Vezina et al., 2004; Takeda et al., 2004; Marchand et al., 2005; Artazcoz et al., 2006).

1.2. Estresse e gestação

Já a mulher, durante o ciclo gravídico-puerperal, uma fase nova e muitas vezes desconhecida de sua vida, encontra-se mais sensível aos efeitos externos (Bale, 2005). Assim, diversas situações podem gerar ansiedade. A primeira gestação, por exemplo, uma situação nova e desconhecida é causa de apreensão para a mulher (Kita, 2000). Um relacionamento instável, uma

gestação não programada ou não desejada, a perda de apoio dos pais ou companheiro, o medo do ambiente hospitalar, do exame físico, do uso de medicações, da perda do atrativo sexual e as dificuldades financeiras podem interferir no equilíbrio psicológico da grávida (Oppenheim, 1985), tornando-a ainda mais susceptível. Destarte, o estresse, como uma gama extensa de estímulos diversos, pode influenciar de forma prejudicial o binômio materno-fetal (Huizinsk et al., 2004), uma vez que os finos e perfeitos processos de adaptação fisiológica que ocorrem neste período podem sofrer sua influência negativa, resultando em efeitos nocivos (Giscombe et al., 2005).

Lembrando que a reação a estímulos tidos como estressantes é individual e depende do gênero, de características sócio-culturais, religiosas e financeiras, encontra-se grande dificuldade no estudo de suas repercussões (Troisi, 2001). De Weerth e Buitelaar (2005) consideram que a reatividade ao estresse parece estar suavizada durante a gravidez, embora as respostas fisiológicas aos estímulos estressantes estejam claramente presentes e apresentem variabilidade inter-individual o suficiente para possibilitar o estudo de correlações entre padrões de resposta, variáveis psicossociais, comportamento fetal, intercorrências da gestação e desenvolvimento fetal.

1.3. Estresse e pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia, segundo a Comissão de Terminologia do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (Hughes, 1972), em conceito adotado pela Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Zugaib e Bittar, 2003) é o desenvolvimento de hipertensão, com proteinúria significativa e/ou edema de mãos e face. Ocorre após a vigésima semana de gravidez, ou anteriormente a esse período na moléstia trofoblástica, sendo predominantemente patologia da primigesta.

Dados epidemiológicos revelam forte correlação entre gestação de mulheres sob condição de estresse e pré-eclâmpsia (Rofe e Goldberg, 1983; Klebanoff et al., 1990; Eskenazi et al., 1991; Saurel-Cubizolles et al., 1991; Landsbergis e Hatch, 1996; Klonoff-Cohen et al., 1996; Wergeland e Strand, 1997), restrição do crescimento intra-uterino (Pagel et al., 1990; Brandt e Nielsen, 1992; Hedegaard et al, 1996-1996A; Rondó et al., 2003; Engel et al., 2005) e prematuridade (Schwartz, 1977; Berkowitz e Kasl, 1983; Heaman et al., 2005). Entretanto, grande parte destes estudos relata a dificuldade de correlacionar o estímulo, quando não os estímulos, sua intensidade, o seu tempo de exposição, se é um estímulo agudo ou crônico, quando foi iniciado e quando cessou ao efeito produzido.

A correlação entre o estresse e a elevação dos níveis pressóricos durante a gestação já é bem estabelecida. Em pesquisa sobre os efeitos de residir por longo tempo em áreas alvo de atividades terroristas e sobre os efeitos da guerra na pressão arterial de 5804 gestantes israelenses, Rofe e Goldberg (1983) detectam que, em períodos de guerra ocorre aumento dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica antes do parto. Esta elevação é maior em gestantes mais jovens e cujo ambiente esteja mais exposto a estímulos estressantes.

Na comparação de gestações de 4.412 médicas residentes, cujo estilo de vida é mais estressante, com 4.236 esposas de médicos residentes, Klebanoff et al. (1990) encontram maior frequência de pré-eclâmpsia naquelas (8,8%) do que nestas (3,5%). Eles observam também maior frequência de relato de trabalho de parto prematuro nas médicas (11% contra 6%), porém não na ocorrência de prematuridade (6,5% contra 6,0%).

Eskenazi et al. (1991) comparam 139 gestantes com a doença e 132 gestantes controle. Encontram, então, correlação entre a pré-eclâmpsia e o trabalho durante a gravidez (com razão de chances = 2,1 e intervalo de confiança de 95% = 1,1–4,4).

A relação entre condições de trabalho e pressão arterial na gestação é alvo de análise da gravidez de 621 trabalhadoras na região de Paris. Saurel-

Cubizolles et al. (1991) observam maior frequência de hipertensão nas mulheres que trabalham durante longos períodos em pé, que carregam peso e que executam trabalho de limpeza pesada.

Por meio de coorte prospectiva com 717 gestantes, na cidade de Nova York, Landsbergis e Hatch (1996) observam aumento da pressão arterial apenas nas gestantes que trabalharam durante o primeiro trimestre (em 25, de um total de 575). Em particular, este aumento da pressão arterial está associado a atividades com baixo poder decisório, entre mulheres com profissões de baixo status (com razão de chances = 2,4 e intervalo de confiança de 95% = 1,1–5,2). Tal resultado é concorde com estudo caso-controle de Klonoff-Cohen et al. (1996) na Califórnia. Na comparação de 110 gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia com 115 gestantes controles, os autores concluem que as gestantes com empregos mais laboriosos apresentam risco maior para ocorrência da doença (com razão de chances = 3,1 e intervalo de confiança de 95% = 1,2–7,8). Além disto, as mulheres que trabalham apresentam risco maior de desenvolver pré-eclâmpsia do que aquelas que não trabalham (com razão de chances = 2,3 e intervalo de confiança de 95% = 1,2–4,6).

Já Wergeland e Strand (1997) realizam levantamento por meio de questionários enviados para todas as parturientes da Noruega antes da alta

hospitalar, num período de 40 dias. Obtendo 87,2% de respostas, observam aumento do risco relativo de pré-eclâmpsia em gestantes que carregam pacotes pesados, que têm ritmo de trabalho intenso, com pouco descanso, que mantêm os braços acima dos ombros durante execução do trabalho e que ingerem mais que quatro copos de café por dia.

Recentemente, por meio de estudo realizado no Japão, na tentativa de encontrar correlação entre o desenvolvimento de hipertensão na gestação e a presença de fatores genético-ambientais, Kobashi (2006) identifica condição mental estressante como potente fator de risco para hipertensão durante a gravidez.

Nisell et al. (1989), no entanto, não observam aumento da ocorrência de doenças hipertensivas na gestação de 345 mulheres na Suécia, em função da intensidade de estresse por elas vivido, conforme questionário realizado no primeiro trimestre da gestação.

Por sua vez, a atividade física na primeira metade da gravidez, como forma de redução dos efeitos causados pelo estresse, conforme observam Marcoux et al. (1989) em trabalho de caso-controle multicêntrico realizado no Canadá, reduz o risco de pré-eclâmpsia (com risco relativo = 0,67 e intervalo de confiança de 95% = 0,46-0,96). Os autores observam também

que o efeito protetor é proporcional ao gasto de energia ocasionado pela atividade.

1.4. Rins e pré-eclâmpsia

Os rins estão tão envolvidos nas manifestações clínicas da pré-eclâmpsia, que há muito têm sido alvo de investigação. Lohlein, no início do século passado, nota espessamento da parede dos capilares glomerulares, assim como edema das células do epitélio glomerular, aumento do número e edema das células endoteliais. Mais tarde, em 1959, com auxílio da microscopia eletrônica, Spargo et al. descrevem alterações nas células glomerulares endoteliais em material de biópsia renal de pacientes com diagnóstico clínico de pré-eclâmpsia, tais como edema celular, vacuolização e hipertrofia de organelas citoplasmáticas. A estas modificações atribuem o nome de endoteliose. Observam ainda outras lesões, incluindo depósitos subendoteliais, alterações na membrana basal e de células epiteliais. Em trabalho mais recente, Spargo et al. (1976) não mencionam depósitos subendoteliais à microscopia óptica e apenas em sete de trinta espécimes de biópsia renal são observados pequenos depósitos à microscopia eletrônica.

Avaliando rins de gestantes saudáveis, Pollak e Nettles (1960) descrevem ausência de alterações histológicas renais à microscopia óptica, por meio de biópsia renal. Ainda durante a gestação normal, Christensen et al. (1989) encontram, à ultra-sonografia de 24 mulheres, volume renal aumentado cerca de 30%, bilateralmente. Este achado reverte uma semana após o parto.

A maior parte dos estudos encontrados na literatura científica analisa rins de gestantes com alguma doença renal. Sheehan (1980), Kincaid-Smith (1991) e Gaber et al. (1994) encontram endoteliose renal tanto em gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia, quanto de hipertensão gestacional. O achado de endoteliose, todavia, não ocorre em todos os casos de biópsia renal de pacientes com diagnóstico clínico de pré-eclâmpsia. Fisher et al. (1981) encontram endoteliose nos capilares dos glomérulos, em biópsia renal, de apenas 84% das nulíparas e de 38% das múltiparas com diagnóstico de pré-eclâmpsia.

Em nosso meio, Kahhale (1996) realiza estudo histológico renal, por meio de biópsia em pacientes com diagnóstico de síndrome hipertensiva específica da gestação. De um total de 305 biópsias renais, conclui que na pré-eclâmpsia leve, a demonstração de endoteliose é de 50%; na pré-eclâmpsia grave e eclâmpsia, a lesão ocorre em sua forma pura em 69% das

gestantes e associada à arteriosclerose e nefropatia em outros 13%, sendo a proteinúria o melhor marcador das alterações histológicas renais.

Em estudo mais recente, Strevens et al. (2003) descrevem biópsias renais de gestantes sem doença, com hipertensão gestacional e com pré-eclâmpsia. Empregam, com esta finalidade, técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica e imunofluorescência. Nas biópsias, encontra-se endoteliose em 5 de 12 pacientes do grupo controle, 7 de 8 pacientes do grupo com hipertensão gestacional e em todas as 25 pacientes com pré-eclâmpsia. Embora o achado nas gestações normais seja de intensidade menor, os autores propõem que a endoteliose não deve ser mais denominada como patognomônica da pré-eclâmpsia. Ainda, consideram que a transição entre gestação normal, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia parece ser um processo contínuo, sendo a pré-eclâmpsia um processo de adaptação extremo, e não uma condição anormal.

Devido ao fato das biópsias renais serem realizadas em tempos diferentes nos diversos estudos, conforme observam Packham et al. (1998), pode-se obter resultados distintos, na dependência de quando é realizada a biópsia. Quanto mais tardia, desaparecem os depósitos subendoteliais e aumentam os capilares glomerulares ocupados pelas células endoteliais e as mudanças no endotélio ficam mais proeminentes.

Por meio destes trabalhos, que correlacionam a presença da pré-eclâmpsia com a ocorrência de alterações renais, observa-se que a endoteliose é encontrada também em rins de gestantes sem doença hipertensiva específica da gestação, mas pode não ser encontrada em gestantes com diagnóstico da mesma, respeitadas as limitações do diagnóstico por meio de biópsia.

1.5. Modelos animais de pré-eclâmpsia

Uma vez estabelecida correlação epidemiológica entre os distintos estímulos nocivos estressantes, e a pré-eclâmpsia, faz-se necessário quantificar esses estímulos e seus efeitos, saber em que fase da gestação eles ocorrem e se isto interfere em sua resposta ou mesmo estabelecer se, uma vez aumentado, diminuído ou interrompido este estímulo, modifica-se o resultado esperado. Da dificuldade de realização de estudos sobre estresse e gestação em humanos, advém a necessidade da utilização de modelos animais.

Por meio do uso de modelos animais, consegue-se padronizar o estímulo gerador de estresse, sua intensidade, duração e início, assim como as condições ambientais envolvidas no estudo. Ao que pese o fato de situações artificiais não refletirem com exatidão o que ocorre

ocasionalmente no dia-a-dia das mulheres gestantes e que a resposta a um estímulo estressante também é variável em animais de experimentação, o desenvolvimento destas condições especiais envolvendo animais permite uma melhor avaliação dos efeitos de determinado estímulo.

1.5.1. Isquemia útero-placentária experimental

Na década de 1970, Cavanagh et al. (1974) propõem um modelo inédito de constrição cirúrgica das artérias uterinas e ligamento das artérias ovarianas de 6 babuínos fêmeas que, ao engravidar, desenvolvem hipertensão e proteinúria no terceiro trimestre da prenhez.

Abitbol et al. (1976 e A; 1977 e A) modificam o protocolo de hipofluxo placentário proposto Cavanagh et al. (1974) e realizam o experimento em coelhas, cadelas e macacas prenhes, por meio da constrição cirúrgica da aorta abdominal e de ramos uterinos das artérias ovarianas. Como resultado, observam alterações similares às constatadas por Cavanagh. Ademais, na avaliação dos rins dos animais à microscopia óptica, evidencia-se endoteliose em 9 de 14 cadelas, 37 de 51 coelhas e em todas as 8 macacas.

Avaliando as repercussões da isquemia placentária em animais prenhes, Eder e McDonald (1988) detectam a elevação da pressão arterial e a

ocorrência de proteinúria em 35 ratas Sprague-Dawley submetidas à redução cirúrgica do fluxo útero-placentário por volta do 14º dia de prenhez. Estas alterações revertem 5 dias após o parto mesmo sem a retirada da constrição. Utilizando modelo similar, Crews et al. (2000) constatarem redução do relaxamento vascular dependente do endotélio em 10 ratas prenhes, quando comparadas a 8 controles prenhes.

1.5.2. Manipulação da síntese de prostaglandinas e óxido nítrico

Palmer et al. (1979), durante realização de estudo sobre carcinogênese química transplacentária em 98 macacas, observam ocorrência ocasional de edema, hipertensão e proteinúria ao final da prenhez de seis delas. Porém, os autores não propõem que a ocorrência de síndrome semelhante à pré-eclâmpsia humana nas macacas esteja correlacionada ao estresse.

Por meio da inibição da síntese do óxido nítrico via subcutânea, Yallampalli e Garfield (1993) obtêm elevação da pressão sistólica de 8 ratas Sprague-Dawley prenhes, assim como redução do peso dos filhotes e aumento de sua mortalidade, em relação aos controles. Não se observa, no entanto, diferença na duração da prenhez entre os grupos. Faas et al. (1994),

por sua vez, propõem administração de baixas doses de endotoxina via cânula jugular em grupos de 8 a 10 ratas Wistar prenhes e observam aumento de suas pressões sangüíneas e de excreção urinária de albumina.

Alexander et al. observam elevação da pressão arterial e redução da quantidade de óxido nítrico sintetase renal (2000) em 9 ratas Sprague-Dawley e aumento de formação de endotelina e tromboxane e diminuição de formação de óxido nítrico e prostaciclina em 10 ratas prenhes com isquemia placentária (2001).

Utilizando a administração intraperitoneal de suramina, um inibidor de angiogênese, em ratas Sprague-Dawley, Nash et al. (2005) constatam elevação dos níveis pressóricos e redução da perfusão renal em relação ao grupo controle, levando a um estado de insuficiência placentária. Tal estado leva também à maior porcentagem de reabsorção fetal e fetos de menor peso.

1.5.3. Manipulação de dietas

Tendo por base alguns estudos epidemiológicos que correlacionam deficiência de selênio (Lu, 1990; Mihailovic et al., 2000) e pré-eclâmpsia, Vanderlelie et al. (2004) desenvolvem modelo da doença em ratas Wistar. No grupo de 6 ratas com deficiência do oligoelemento não se observa

diminuição do peso placentário ou do número de fetos por prenhez, entretanto o peso dos filhotes é menor do que no grupo controle.

Colomina et al. (2005), avaliando a ingestão de alumínio dissolvido na água e a imobilização durante a prenhez de ratas Sprague-Dawley, divididas em grupos de 9 a 19 ratas, demonstram que as ratas prenhes submetidas ao estímulo estressante reduzem o consumo de comida e o ganho de peso em relação às ratas do grupo controle.

1.5.4. Exposição ao frio

Kanayama et al. (1997) observaram proteinúria e hipertensão em ratas prenhes submetidas ao estresse pelo frio, assim como demonstraram depósitos fibrinóides nos capilares glomerulares nestas ratas. Em outro estudo, Kanayama et al. (1999), utilizando vários estímulos que levam os animais de experimentação ao estresse, encontram alterações semelhantes as da pré-eclâmpsia em 14 ratas prenhes expostas ao estresse pelo frio e pela alteração dos horários de alimentação (durante o dia, ao invés da noite), quando comparadas ao grupo controle e não prenhe. Observam, desta maneira, alterações tais como elevação plasmática da concentração do fator liberador de corticotropina, epinefrina, norepinefrina e insulina, associados à diminuição da contagem plaquetária. Em modelo animal idêntico, Khatun et

al. (1999) descrevem alterações histológicas renais em 10 ratas Wistar prenhes com aumento difuso dos glomérulos e deposição de fibrina na luz de capilares endoteliais.

1.5.5. Exposição ao estresse sônico e superpopulação

Em nosso meio, Takiuti et al. (2002) propõem um modelo experimental de estresse, que associa a exposição a um estímulo sonoro, a superpopulação, o confinamento e a imobilização de ratas Wistar prenhes. Neste estudo é avaliado um grupo de 16 ratas prenhes submetidas ao estímulo e seus controles, prenhes e não prenhes. Observa-se que o estímulo estressante leva ao aumento da pressão arterial, aumento do peso da supra-renal, aumento da vasomotilidade, menor liberação de fator relaxante derivado do endotélio, diminuição do ganho de peso materno, proteinúria e redução do peso fetal.

Martins (2004), utilizando o mesmo modelo, observa, em ratas Wistar prenhes, atenuação da resposta pressora à angiotensina II, sendo que tal característica é inibida quando esses animais são submetidos a estresse emocional.

1.6. Modelos de pré-eclâmpsia em ratos

Desenvolver ou utilizar um modelo experimental já existente implica considerar alguns aspectos, tais quais: o animal empregado, seu tipo de prenhez, sua placentação e o estímulo utilizado como estressante.

Para se comparar o resultado de uma prenhez animal com a gestação humana, parece óbvio que o melhor modelo seria aquele que empregasse primatas, já que estes guardam maior semelhança filogenética com o ser humano. Contudo, o grande custo envolvido na sua obtenção e manutenção, as dificuldades implicadas no seu processo reprodutivo e a longa duração de sua gestação dificultam o emprego de modelos que utilizam o macaco (Mandavilli, 2006). Outras espécies de mamíferos de prenhez única ou dupla, tais quais as ovelhas também oferecem dificuldade semelhante.

Considerando-se o desenvolvimento de certo modelo experimental, deve-se ter em vista que seu custo é menor quanto mais fácil a obtenção e manutenção dos animais, maior facilidade reprodutiva e menor duração da prenhez. Conclui-se, então, que os animais de interesse seriam aqueles de pequeno porte, como cães, gatos, coelhos, ratos e camundongos (Auroux, 1995).

Há inúmeros modelos experimentais que utilizam animais de pequeno porte para estudar as doenças hipertensivas na gestação. No entanto, os modelos animais mais adotados para estudo das doenças relacionadas à gestação são os que utilizam ratos. Alia-se a sua fácil reprodutibilidade, o fato da placentação dos ratos ser do tipo hemocorial, similar à humana (Vercruysse et al., 2006).

Pouco se sabe sobre os diversos mecanismos de ação do estresse, tão variável agente etiológico, o que torna necessária a realização de mais estudos sobre o tema. A pesquisa sobre tal assunto em pacientes gestantes é de difícil execução e esbarra em delicados princípios éticos (Lupton e Williams, 2004), daí advém a importância do desenvolvimento e utilização de modelos experimentais que colaborem com a compreensão de tema tão complexo (Reynolds et al., 2005). Contudo, poucos são os trabalhos encontrados na literatura médica sobre o emprego de modelos animais que utilizam estímulos estressantes e que analisam seus efeitos sobre a gestação (Kanayama et al., 1997; Takiuti et al., 2002; Vanderlelie et al., 2004).

Apesar de haver muitos trabalhos que descrevem as alterações renais que ocorrem em pacientes com o diagnóstico clínico de pré-eclâmpsia, não existem trabalhos na literatura médica que correlacionem estes achados com a exposição ao estresse, a despeito da forte correlação epidemiológica entre

o estresse e a pré-eclâmpsia. A falta de considerações sobre estes temas - estresse, pré-eclâmpsia e alterações renais - deixa importante lacuna a ser preenchida.

Desta maneira, a necessidade de entender os efeitos do estresse sobre a gestação motiva a execução do presente estudo, que visa analisar os efeitos do estímulo estressante crônico, representado pelo estímulo sônico e pela super-população, sobre a histologia renal de ratas Wistar no vigésimo dia de prenhez.

2 Proposição

Sabendo-se da existência de correlação epidemiológica entre processos patológicos específicos da gestação em humanos e o estresse e considerando-se a necessidade de melhor entender a ação deste sobre a gravidez, encontra-se grande estímulo para a realização do presente estudo, que se propõe a avaliar as repercussões materno-fetais do estresse no modelo experimental que utiliza o estímulo sonoro, a superpopulação e a imobilização em ratas Wistar prenhes. Desta forma, apresentam-se como objetivos:

I- Objetivo principal:

1. Avaliar as repercussões histológicas do estímulo estressante em rins de ratas Wistar prenhes e não prenhes.

II- Objetivos secundários:

2. Avaliar as repercussões do estímulo estressante sobre parâmetros maternos (peso, ganho de peso, pressão arterial caudal).

3. Avaliar as repercussões do estímulo estressante sobre parâmetros fetais (peso do feto e peso da placenta).

3 Material e Método

3.1. Material

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Obstétrica (Laboratório de Investigação Médica 57) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, localizado nas salas 2111 e 2113, segundo andar do prédio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de maio a novembro de 2005.

Os animais utilizados no desenvolvimento do trabalho experimental foram ratas Wistar normotensas com nove a doze semanas de vida e pesando aproximadamente 235 gramas.

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Conselho do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e obedeceu à legislação nacional sobre o uso de animais em laboratório.

3.2. Operacionalização dos experimentos

As ratas foram transferidas do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para o biotério do Laboratório de

Fisiologia Obstétrica (LIM 57), uma semana antes do início dos experimentos. Neste período, denominado período de aclimação, até o final da experimentação, as ratas foram mantidas em ambiente com ciclo claro-escuro (12 horas de claridade durante dia e 12 horas de escuridão durante a noite). A temperatura do ambiente foi mantida constante em $24 \pm 1^\circ \text{C}$. No início e final do período de aclimação, os animais tiveram seus pesos determinados.

3.2.1. Acasalamento dos animais

O acasalamento dos animais foi feito colocando-se à noite um macho em uma gaiola com quatro a seis fêmeas. Na manhã seguinte, o esfregaço vaginal foi realizado e a presença de espermatozóides identificou o dia de acasalamento. Este dia foi considerado o primeiro dia da prenhez. O período de gestação das ratas tem duração de vinte e dois dias.

3.3. Experimentos

3.3.1. Determinação dos grupos

Animais prenhes e não prenhes foram submetidos ao estresse crônico, determinado por 100 decibéis de ruído e pela superpopulação, e ao estresse agudo, provocado por imobilização do animal durante 30 minutos. Nas ratas prenhes, o estímulo crônico foi realizado entre o 7º e o 14º dia da prenhez e num período equivalente nas não prenhes. Após este período, os animais foram mantidos 5 dias sem o estímulo crônico. O estímulo agudo foi realizado no 18º dia do experimento, dois dias antes do animal ser sacrificado. Todos os animais foram sacrificados no 20º dia da prenhez, ou em período equivalente nas ratas não prenhes.

As ratas foram divididas em quatro grupos experimentais:

- Grupo 1 – Não prenhes controles (NC)

Ratas não prenhes, não submetidas a nenhum tratamento crônico, porém submetidas a estímulo estressante agudo.

- Grupo 2 – Não prenhes estimuladas (NE)

Ratas não prenhes, submetidas a tratamento crônico durante sete dias e a estímulo estressante agudo.

- Grupo 3 – Prenhes controles (PC)

Ratas prenhes, não submetidas a nenhum tratamento crônico, porém submetidas a estímulo estressante agudo.

- Grupo 4 – Prenhes estimuladas (PE)

Ratas prenhes, submetidas a tratamento crônico durante sete dias e a estímulo estressante agudo.

3.3.2. Tratamento estressante crônico e agudo

O estudo visou avaliar as repercussões maternas e fetais do estresse. O estímulo estressante foi realizado de forma crônica e aguda. O tratamento crônico consistiu na associação do estímulo sônico e da competição provocada pela superpopulação das ratas que habitaram a gaiola. O estresse agudo foi provocado pela imobilização do animal para aferição da pressão arterial caudal.

O estímulo sônico foi feito por meio de alarme tímpano mecânico marca Sincron modelo TT6, capaz de gerar ruído de 100 decibéis na sua proximidade. Este alarme foi conectado a um dispositivo tipo *timmer*, que mantinha o estímulo durante 30 minutos e interrompia-o por intervalo de 90 minutos, o que totalizava cerca de 6 horas de estímulo sônico por dia. O

tratamento crônico consistiu também em colocar oito animais em uma gaiola com largura de 18 cm, comprimento de 24 cm e altura de 20 cm, com área total de 432 cm², restando espaço de 54 cm² para cada animal. Na gaiola foram colocados animais prenhes e não prenhes submetidos ao tratamento. A competição gerada pela falta de espaço pode ser também um estímulo estressante.

As ratas prenhes foram submetidas ao estímulo crônico apenas a partir da segunda semana da prenhez a fim de evitar interrupção precoce da mesma.

O alimento e água oferecidos foram suficientes para as necessidades de todos os animais na gaiola. A quantidade de alimento colocada na gaiola foi de aproximadamente 20 gramas de ração por animal por dia, para todos os animais do estudo, recolocada diariamente com o cuidado de sempre sobrar alimento e água na gaiola.

As gaiolas foram colocadas dentro de uma caixa de madeira de 50 cm de largura, 40 cm de comprimento e 80 cm de altura, com capacidade para quatro gaiolas. No interior da caixa foram colocados: o alarme timpânico, o sistema de iluminação com ciclo claro/escuro e o sistema de ventilação e exaustão, que mantinha a temperatura em torno de apenas 1-2° C acima da temperatura do ambiente do laboratório e biotério. Externamente a esta

caixa, uma outra caixa, de papelão com lã de vidro, cobria totalmente a caixa de madeira, garantindo isolamento acústico satisfatório para os outros animais. Essas caixas foram mantidas no laboratório, que está separado do biotério por uma porta, garantindo um bom isolamento acústico para os animais do grupo controle.

O estresse agudo foi provocado pela imobilização do animal durante 30 minutos em ambiente com 37° C, ocasião em que era aferida a pressão arterial caudal. As pequenas gaiolas apresentavam forma de cilindro com 15 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro. O estímulo agudo foi realizado dois dias antes da interrupção da gestação, ou seja, no 18º dia da prenhez, ou período equivalente nas ratas não prenhes.

Os animais do grupo controle foram mantidos no biotério do laboratório que possui as seguintes dimensões: 1,70 m de largura, 3,30 m de comprimento e 2,90 m de altura. Alguns procedimentos realizados com os animais eram realizados neste local, tais como: coleta de esfregaço vaginal para pesquisa de presença de espermatozóides, identificação e pesagem dos animais, colocação dos animais nas pequenas gaiolas para determinação da pressão arterial caudal, manutenção e limpeza a cada dois dias. Deste modo, os animais de todos os grupos visualizaram os procedimentos realizados.

3.3.3. Sacrifício dos Animais

Todos os animais foram sacrificados no 20º dia de prenhez ou em período equivalente nas ratas não prenhes, isto é, seis dias após cessado o estímulo estressante crônico e 2 dias após o estímulo estressante agudo.

Os animais foram anestesiados com Xilasina (10 mg por kg) e Ketamina (75 mg por kg) via intra-peritoneal e submetidos à laparotomia, a fim de retirar os fetos e placentas dos animais prenhes e rins de todos os animais.

3.4. Parâmetros avaliados durante os experimentos

3.4.1. Determinação do peso dos animais

O peso de cada animal dos grupos prenhes foi medido na sua chegada ao biotério do Laboratório de Fisiologia Obstétrica (peso no início da aclimatação – PIA), ao final do período de aclimatação – início do experimento (P1), no 7º dia da prenhez (P2), no 14º dia da prenhez (P3) e 20º dia da prenhez (P4), logo antes do sacrifício e em períodos equivalentes nos animais não prenhes.

O ganho de peso dos animais entre cada uma das medidas foi determinado pela diferença $P2 - P1$ e assim sucessivamente, e foi chamado de ganho 1 ($G1 = P2 - P1$), ganho 2 ($G2 = P3 - P2$), ganho 3 ($G3 = P4 - P3$) e ganho total ($GT = P4 - P1$). O ganho de peso no período de aclimação foi denominado GA ($P1 - PIA$).

3.4.2. Determinação da pressão arterial caudal dos animais

A pressão arterial caudal de cada animal foi aferida em dois momentos: dois dias antes dos animais serem submetidos ao estímulo estressante crônico (5º dia da prenhez – PA1) e dois dias antes do sacrifício (18º dia da prenhez – PA2). A aferição foi realizada em período equivalente nas ratas não prenhes e do grupo prenhe controle.

A determinação da segunda medida de pressão arterial foi utilizada como estímulo estressante agudo, conforme salientado anteriormente.

A pressão arterial caudal foi medida por meio de esfigmomanômetro elétrico na porção proximal da cauda do animal e um sensor captou o pulso da artéria caudal na porção distal. Estas medidas foram realizadas por aparelho *Storage Pressure Meter* modelo LE5002 da LETICA S/A – *Scientific Instruments* (Barcelona – Espanha), especialmente desenvolvido

para esta finalidade. Durante a determinação da pressão arterial caudal, os animais permaneciam em pequenas gaiolas que restringiam seus movimentos e mantinham a cauda livre, ambos dentro de uma caixa aquecida a 37° C. Nesta caixa – *Rat Scanner*, Ugo Basile (Itália) – cinco pequenas gaiolas alojavam-se no seu interior, onde os animais eram mantidos aquecidos e cobertos com pano, mantendo-os na escuridão. Um sistema com interruptor direcionava a pressão de pulso e a recepção dos sinais. Como o acionamento para iniciar a medida da pressão arterial era controlado externamente, não se necessitou de manipulação direta dos animais. Geralmente, o sinal de pulso era captado vinte minutos após a colocação do animal dentro da caixa, mas o mesmo, na segunda medida (PA2) era mantido durante 30 minutos, conforme padronização do estímulo estressante agudo. Nas ratas não prenhes, a pressão arterial foi aferida em período equivalente.

3.4.3. Determinação dos pesos das placentas e fetos

Os fetos e placentas de vinte dias dos grupos prenhes foram pesados, separadamente, em balança analítica AA-160, Denver Instrument Company.

3.4.4. Coleta dos Rins

Os rins, após retirados, foram fixados em formol 10% por 12 horas e incluídos em parafina conforme procedimento de rotina. Foram realizados cortes transversais de 3 micrômetros e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson (Montes, 1996).

3.4.5. Avaliação dos rins à microscopia óptica

Todas as lâminas com os rins foram avaliadas à microscopia óptica por dois observadores, no Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM 16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5. Análise estatística

As diversas variáveis do trabalho foram avaliadas pelo ONEWAY ANOVA. A discriminação das diferenças entre os grupos foi realizada pelo teste de Student-Newman-Keuls. O *software* utilizado foi o SIGMASTAT *Statistical Software* versão 2.0 para Windows 95, sendo aceito como significativo um valor de $p < 0,05$.

Os pesos dos fetos e placentas foram avaliados pelo teste T de Student. A avaliação de tendência entre estas duas variáveis foi realizada pelo cálculo do coeficiente de correlação, com nível de significância analisado pelo teste T. O coeficiente de regressão na análise de regressão linear entre peso do feto e placenta foi calculado e seu nível de significância testado pelo teste T. Os valores diferenciais aceitos para a probabilidade dos grupos testados serem iguais ou diferentes foram de 5% ($p < 0,05$).

A avaliação das diferenças do número de fetos com percentil de peso abaixo de 3, 5, 10 e acima de 10 foi realizada pelo teste do Chi-Quadrado, com valor de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1. Avaliação renal

Os rins de todas as 10 ratas Wistar de cada grupo (não prenhe controle, não prenhe estresse, prenhe controle e prenhe estresse) foram analisados à microscopia óptica, a fim de observar possíveis alterações decorrentes dos estímulos estressantes. Em nenhum dos quatro grupos, no entanto, foram observadas alterações significativas. Foram, então, constatadas as seguintes características:

- a) Parênquima renal com arquitetura preservada.
- b) Glomérulos com estrutura conservada. Celularidade dentro do normal, capilares com luz patente, espaços de Bowman livres.
- c) Interstício sem alterações significativas.
- d) Túbulos com epitélio preservado. Membrana basal íntegra e delgada.
- e) Vasos com endotélio preservado e paredes sem alterações.

São apresentadas a seguir imagens à microscopia óptica representativas dos quatro grupos avaliados.

Figura 1 – Rim de rata do grupo não prenhe controle. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X).

Figura 2 – Rim de rata do grupo não prenhe estresse. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X).

Figura 3 – Rim de rata do grupo prenhe controle. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X).

Figura 4 – Rim de rata do grupo prenhe estresse. Parênquima renal com estrutura geral preservada (Tricrômico de Masson, aumento de 40X).

4.2. Repercussão do estímulo estressante sobre os parâmetros maternos

O estímulo estressante crônico, provocado pelo som e pela superpopulação, do sétimo ao décimo quarto dia do experimento, e o agudo, provocado pela imobilização para aferição da pressão arterial caudal, provocaram algumas alterações nos parâmetros maternos avaliados (peso e pressão arterial caudal). Estão apresentados a seguir os respectivos parâmetros nas ratas prenhes e não prenhes submetidas ao estresse, assim como em seus controles não estimulados.

4.2.1. Avaliação do peso dos animais

Os animais que foram alocados no grupo prenhe controle eram estatisticamente mais leves que os animais que foram alocados no grupo não prenhe estresse no início do período de aclimação (tabela 1). Essa diferença não foi mais observada no primeiro dia do experimento, quando todos os grupos possuíam em média pesos estatisticamente iguais (tabela 2).

Tabela 1 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (PIA = início do período de aclimação).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
PIA	228,6 $\pm$ 13,14	232,9 $\pm$ 9,59 ^{α}	215,3 $\pm$ 14,00 ^{α}	226 $\pm$ 15,60

$\alpha - p = 0,030$.

Tabela 2 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P1 = início do experimento – 1º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
P1	238,2 $\pm$ 19,53	239,4 $\pm$ 10,60	232,3 $\pm$ 9,84	236,6 $\pm$ 13,35

As ratas dos grupos prenhes, no sétimo dia de prenhez, possuíam pesos estatisticamente iguais entre si, porém estatisticamente maiores do que o peso das ratas do grupo não prenhe controle (tabela 3).

Tabela 3 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P2 = início do estímulo, ou período equivalente – 7º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
P2	242,4 $\pm$ 17,46 ^{$\alpha\beta$}	252,2 $\pm$ 15,67	264,9 $\pm$ 13,35 ^{β}	265,2 $\pm$ 14,86 ^{α}

$\alpha - p = 0,014$; $\beta - p = 0,009$

No décimo quarto dia do experimento, ao final do estímulo estressante crônico, ou período equivalente, houve diferença estatística entre o peso das ratas do grupo prenhe estresse e o das ratas do grupo prenhe controle. De modo semelhante, as ratas do grupo não prenhe estresse tiveram peso estatisticamente menor do que o das ratas do grupo não prenhe controle (tabela 4).

Tabela 4 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P3 = final do estímulo, ou período equivalente – 14º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
P3	255,8 $\pm$ 16,78 ^{$\gamma\delta$}	236,0 $\pm$ 16,83 ^{$\alpha\delta$}	300,2 $\pm$ 16,74 ^{$\alpha\beta\gamma$}	247,1 $\pm$ 12,94 ^{β}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p < 0,001$; $\gamma - p < 0,001$; $\delta - p = 0,028$

Ao final do experimento, no vigésimo dia, houve diferença estatística entre os pesos das ratas dos grupos prenhes e das ratas dos grupos não prenhes, sendo maior nas primeiras; entretanto, o peso das ratas do grupo prenhe estresse foi estatisticamente menor que o peso das ratas do grupo prenhe controle (tabela 5).

Tabela 5 – Médias de pesos (P) em gramas de cada grupo $\pm$ desvio padrão (P4 = final do experimento – 20º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
P4	259,6 $\pm$ 18,88 ^{$\beta\epsilon$}	251,9 $\pm$ 15,83 ^{$\alpha\delta$}	341,6 $\pm$ 15,54 ^{$\alpha\beta\gamma$}	305,6 $\pm$ 24,55 ^{$\gamma\delta\epsilon$}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p < 0,001$; $\gamma - p < 0,001$; $\delta - p < 0,001$; $\epsilon - p < 0,001$

Os animais prenhes do grupo submetido ao estresse crônico possuem peso estatisticamente maior em média, que os animais do grupo não prenhe controle, nas medidas realizadas no sétimo e vigésimo dias do experimento. Diferente do observado nos grupos controles, no décimo quarto dia do experimento não houve diferença estatística entre o peso das ratas do grupo prenhe estresse e o peso das ratas do grupo não prenhe estresse (tabela 4).

O estímulo estressante crônico prévio levou ao menor peso dos animais dos grupos prenhe estresse e não prenhe estresse ao final do estímulo (no décimo quarto dia), em relação aos seus grupos controle (tabela 4), e ao menor peso ao final do experimento nas ratas do grupo prenhe estresse, em relação ao grupo prenhe controle (tabela 5). Todas as diferenças apresentaram significância estatística.

Quando analisado o ganho de peso dos animais, as ratas que foram alocadas no grupo prenhe controle apresentaram ganho estatisticamente maior no período de aclimação do que as ratas do grupo não prenhe

estresse (tabela 6). Assim, como havia diferença de peso das ratas que viriam a constituir estes dois grupos (tabela 1), esta diferença foi compensada neste período e todos os grupos apresentaram pesos idênticos no início do experimento (tabela 2).

Tabela 6 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (GA = período de aclimação).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
GA	9,6 $\pm$ 6,6	6,5 $\pm$ 5,6 ^{α}	17,0 $\pm$ 11,60 ^{α}	10,5 $\pm$ 7,4

$\alpha - p = 0,033$

No período compreendido entre o início do experimento e o início do estímulo estressante, as ratas dos grupos prenhes ganharam mais peso, com significância estatística, que as ratas dos grupos não prenhes (tabela 7).

Tabela 7 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (G1 = do início do experimento ao início do estímulo, ou período equivalente – 1º ao 7º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
G1	4,2 $\pm$ 14,7 ^{$\alpha\gamma$}	12,8 $\pm$ 12,2 ^{$\beta\delta$}	32,6 $\pm$ 9,4 ^{$\alpha\beta$}	28,6 $\pm$ 7,7 ^{$\gamma\delta$}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p = 0,001$; $\gamma - p < 0,001$; $\delta - p = 0,004$

Durante o período em que as ratas do grupo estresse eram submetidas ao estímulo, não houve diferença de perda de peso entre as ratas do grupo prenhe estresse e as do grupo não prenhe estresse. As ratas do grupo prenhe controle apresentaram ganho de peso estatisticamente maior que as ratas do

grupo não prenhe controle, o que não se observou nas ratas dos grupos estresses (tabela 8).

Tabela 8 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (G2 = do início ao final do estímulo, ou período equivalente – 7º ao 14º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
G2	13,4 $\pm$ 5,7 ^{$\gamma\delta\epsilon$}	-16,2 $\pm$ 10,9 ^{$\beta\epsilon$}	35,3 $\pm$ 7,4 ^{$\alpha\beta\gamma$}	-18,1 $\pm$ 13,3 ^{$\alpha\delta$}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p < 0,001$; $\gamma - p < 0,001$; $\delta - p < 0,001$; $\epsilon - p < 0,001$

Com o final do estímulo, as ratas dos grupos estresses passaram a ganhar mais peso, com diferença estatística, do que os seus controles e, no período entre o final do estímulo e o final do experimento, todos os grupos apresentaram diferença significativa de ganho de peso entre si (tabela 9).

Tabela 9 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (G3 = do final do estímulo ao final do experimento, ou período equivalente – 14º ao 20º dia).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
G3	3,8 $\pm$ 4,3 ^{$\alpha\delta\zeta$}	15,9 $\pm$ 12,9 ^{$\beta\epsilon\zeta$}	41,4 $\pm$ 9,4 ^{$\gamma\delta\epsilon$}	58,5 $\pm$ 20,3 ^{$\alpha\beta\gamma$}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p < 0,001$; $\gamma - p = 0,006$; $\delta - p < 0,001$; $\epsilon - p < 0,001$; $\zeta - p = 0,046$

Ao final do experimento, o ganho total de peso das ratas dos grupos prenhes foi estatisticamente maior do que o das ratas dos grupos não prenhes. As ratas do grupo prenhe estresse apresentaram ganho de peso menor do que as do grupo prenhe controle, havendo diferença estatística

entre os grupos. Já as ratas dos grupos não prenhes não apresentaram diferença de ganho de peso, entre si, durante o experimento (tabela 10).

Tabela 10 – Médias de ganho de peso (G) em gramas de cada grupo por período $\pm$ desvio padrão (GT = ganho de peso durante o experimento, exceto período de aclimação).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
GT	21,4 $\pm$ 14,8 ^{$\beta\epsilon$}	12,5 $\pm$ 9,5 ^{$\alpha\delta$}	109,3 $\pm$ 11,7 ^{$\alpha\beta\gamma$}	69,0 $\pm$ 15,9 ^{$\gamma\delta\epsilon$}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p < 0,001$; $\gamma - p < 0,001$; $\delta - p < 0,001$; $\epsilon - p < 0,001$

4.2.2. Avaliação da pressão arterial caudal dos animais

As pressões arteriais caudais de cada animal foram aferidas em dois momentos: dois dias antes dos animais serem submetidos ao estímulo estressante crônico, ou seja, no quinto dia da prenhez e dois dias antes do sacrifício, ou seja, no décimo oitavo dia da prenhez. A aferição foi realizada em período equivalente nas ratas não prenhez e nas do grupo prenhe controle (tabelas 11 e 12).

Não se encontrou diferença estatística na medida de pressão arterial caudal sistólica, diastólica e a média das pressões no quinto dia do experimento entre os grupos (tabela 11).

Tabela 11 – Médias das medidas de pressão arterial caudal de cada grupo no quinto dia da prenhez ou período equivalente $\pm$ desvio padrão em mmHg (PAS = pressão arterial caudal sistólica; PAD = pressão arterial caudal diastólica; PAM = média das pressões arteriais caudais sistólica e diastólica; 1 = medida no 5º dia do experimento).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
PAS1	146,6 $\pm$ 7,5	147,8 $\pm$ 6,2	144,2 $\pm$ 16,6	148,9 $\pm$ 9,2
PAD1	90,3 $\pm$ 11,3	87,4 $\pm$ 4,9	89,0 $\pm$ 16,9	87,0 $\pm$ 14,1
PAM1	106,2 $\pm$ 8,3	106,0 $\pm$ 4,4	106,7 $\pm$ 15,8	104,2 $\pm$ 11,9

A pressão arterial sistólica das ratas do grupo prenhe controle, no décimo oitavo dia do experimento, foi estatisticamente menor do que a pressão dos demais grupos, que eram iguais entre si. As medidas de pressão diastólica e da média das pressões, dos grupos não prenhes não apresentaram diferença estatística entre si; entretanto, entre as medidas dos grupos prenhes, as do grupo prenhe controle foram estatisticamente menores que as do grupo prenhe estresse (tabela 12).

Tabela 12 – Médias das medidas de pressão arterial caudal de cada grupo no décimo oitavo dia da prenhez ou período equivalente $\pm$ desvio padrão em mmHg (PAS = pressão arterial caudal sistólica; PAD = pressão arterial caudal diastólica; PAM = média das pressões arteriais caudais sistólica e diastólica; 2 = medida no 18º dia do experimento).

GRUPO	NC (10)	NE (10)	PC (10)	PE (10)
PAS2	147,0 $\pm$ 11,0 ^{γ}	148,9 $\pm$ 8,4 ^{β}	129,1 $\pm$ 13,1 ^{$\alpha\beta\gamma$}	154,4 $\pm$ 14,2 ^{α}
PAD2	89,1 $\pm$ 11,1	89,8 $\pm$ 10,6	79,9 $\pm$ 18,1 ^{δ}	89,0 $\pm$ 8,7 ^{δ}
PAM2	108,2 $\pm$ 9,7	108,8 $\pm$ 10,1	96,0 $\pm$ 15,3 ^{ϵ}	114,9 $\pm$ 12,9 ^{ϵ}

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p = 0,002$; $\gamma - p = 0,002$; $\delta - p = 0,014$; $\epsilon - p = 0,007$

4.3. Repercussão do estímulo estressante sobre os parâmetros feto-placentários

4.3.1. Avaliação do peso dos fetos e das placentas

Todas as ratas foram sacrificadas no vigésimo dia do protocolo e os fetos e respectivas placentas foram contados e pesados.

As ratas do grupo prenhe controle tiveram, em média, número estatisticamente igual de fetos por prenhez. A média dos pesos fetais das ratas do grupo prenhe estresse no vigésimo dia da prenhez foi estatisticamente menor que a média dos pesos dos fetos das ratas do grupo prenhe controle. O mesmo se observou para o peso das respectivas placentas (Tabela 13).

Tabela 13 – Médias de pesos em gramas dos fetos e placentas de cada grupo $\pm$ desvio padrão ao final do experimento – 20º dia e número médio de fetos por prenhez por rata em cada grupo.

GRUPO	PC (10)	PE (10)
PESO FETAL MÉDIO	2,95 $\pm$ 0,53 ^{α}	2,54 $\pm$ 0,32 ^{α}
PESO PLACENTÁRIO MÉDIO	0,60 $\pm$ 0,08 ^{β}	0,53 $\pm$ 0,09 ^{β}
NÚMERO MÉDIO DE FETOS E PLACENTAS	14,3 $\pm$ 1,6	13,5 $\pm$ 3,1

$\alpha - p < 0,0001$; $\beta - p < 0,0001$

4.4. Análise de modelo de restrição do crescimento intra-uterino em ratas prenhes submetidas ao estresse

Observa-se que, levando em consideração a curva de percentil de peso obtida a partir do peso dos fetos do grupo controle no vigésimo dia da prenhez, as razões de chance entre o número de fetos do grupo estresse e do grupo controle que se encontram abaixo dos percentis 3, 5 e 10 são estatisticamente diferentes (tabela 14).

Tabela 14 – Comparação do número de fetos com peso abaixo dos percentis 3, 5 e 10 (calculados a partir do grupo controle para 20 dias de prenhez) entre os grupos prenhe controle e prenhe estresse.

	PC (145)	PE (139)	OR	IC
Abaixo do P3	5 ^{α}	35 ^{α}	9,42	8,04 – 11,05
Abaixo do P5	8 ^{β}	37 ^{β}	6,21	5,34 – 7,22
Abaixo do P10	15 ^{γ}	50 ^{γ}	4,87	4,33 – 5,47
Acima de P10	130 ^{δ}	89 ^{δ}	0,18	0,18 – 0,23

$\alpha - p < 0,001$; $\beta - p < 0,001$; $\gamma - p < 0,001$; $\delta - p < 0,001$

5 Discussão

A análise das repercussões de um estímulo estressante sobre a gestação é de suma importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia de doenças sabidamente correlacionadas ao estresse que acometem o binômio materno-fetal. A compreensão desta relação de causa-efeito possibilitaria uma atuação preventiva mais eficaz, na tentativa de atenuar, ou mesmo evitar, a ação prejudicial de um agente estressor e o desencadeamento de processos que levam ao aumento da morbi-mortalidade materna e neonatal.

Tal entendimento seria mais facilmente atingido se fosse possível atuar de forma livre sobre a gestação determinando o tipo de estímulo a ser utilizado como estressor, em que fase da gestação ele é mais nocivo, se for, padronizando seu início, fim e intensidade exatos ou dosando seus efeitos na mãe e no conceito, seja realizando o acompanhamento do desenvolvimento neonatal ou da evolução materna ante, intra e pós-parto. Tamanha liberdade de ação em estudos científicos só é possível dentro de limites éticos com a utilização de modelos animais, a despeito destes envolverem situações artificiais que dificilmente são observados no dia a dia das gestantes.

5.1. Avaliação renal

O estresse crônico, representado pelo estímulo sônico e pela superpopulação, do sétimo ao décimo quarto dia da prenhez ou período equivalente nas ratas não prenhes, não acarretou alterações histológicas à microscopia óptica em rins de ratas com vinte dias de prenhez, ou seja, seis dias após o fim do estímulo, ou nas ratas não prenhes em período equivalente. Em modelo experimental de pré-eclâmpsia por meio da infusão de endotoxina, Faas et al. (1994) demonstraram, ao analisarem os rins das ratas que desenvolveram a doença, presença de depósito de fibrinogênio em glomérulos à imunohistoquímica. Kanayama et al. (1997) descreveram, também à imunohistoquímica, aumento de depósitos fibrinóides subendoteliais nos capilares glomerulares de rins de ratas prenhes submetidas ao estresse pelo frio. Khatun et al. (1999), empregando modelo de Kanayama et al. (1997), observaram presença de alargamento difuso dos glomérulos com obliteração dos espaços de Bowman, estreitamento da luz dos túbulos contornados e deposição de fibrina na luz dos capilares glomerulares, à análise histológica. Em tempo, cabe citar que a endotoxina utilizada por Faas et al. (1994) produzia reação vascular sistêmica e que o estímulo empregado por Kanayama et al. (1999) era tão intenso (as patas das

ratas ficavam a 0° C por quinze dias) que poderia levar a necrose de extremidades. Em outros modelos experimentais de pré-eclâmpsia em ratas (Eder e McDonald, 1998; Yallampalli e Garfield, 1993; Alexander et al., 2000; Takiuti et al., 2002; Vanderlelie et al., 2004), os autores não descrevem a avaliação histológica dos rins das ratas prenhes que desenvolviam a doença.

Segundo Takiuti et al. (2002), utilizando modelo experimental idêntico ao apresentado no presente estudo, foram observadas alterações similares às que ocorrem na pré-eclâmpsia humana. Os autores observaram que as ratas prenhes submetidas ao estresse crônico apresentavam maior pressão arterial, vasomotilidade aumentada em teste de relaxamento com acetilcolina, menor peso fetal médio e maior proteinúria, em relação aos seus controles prenhes.

Bakoush et al. (2004) encontraram proteinúria em ratos Wistar normais, demonstrando que a proteinúria não é exclusiva de ratas prenhes. Em modelos experimentais de pré-eclâmpsia (Eder e McDonald, 1988; Yallampalli e Garfield, 1993; Faas et al., 1994; Kanayama et al., 1997; Alexander et al., 2001; Takiuti et al., 2002; Vanderlelie et al. 2004) observou-se proteinúria em ratas prenhes controle. Estes trabalhos comprovaram que a ocorrência de proteinúria não é exclusiva dos animais

que desenvolviam a doença, podendo ocorrer em ratos normais e em ratas prenhes normais; no entanto, como observado na pré-eclâmpsia em humanos, nesses modelos experimentais há o aumento da proteinúria, associado à elevação da pressão arterial nas ratas prenhes.

O fato de não estarem demonstradas as alterações histológicas renais à microscopia óptica no presente estudo, não impede a aplicação do modelo, uma vez que a repercussão clínica da possível alteração morfo-funcional renal (aqui traduzida em achado de maior proteinúria nas ratas do grupo estresse) relatada por Takiuti et al. (2002) encontrava-se presente. Apesar de não terem sido observadas alterações renais à microscopia óptica, isto não implica que alterações histológicas não possam ocorrer ou estar presentes. Sua demonstração poderia ocorrer caso se utilizem outros métodos – imuno-histoquímicos ou microscopia eletrônica. Porém, traçando-se um paralelo com os achados histológicos na pré-eclâmpsia humana, tais métodos apenas seriam empregados para o estudo de lesões graves ou persistentes (Gärtner et al, 1998) e a alteração histológica não se faz necessária para o diagnóstico desta doença, uma vez que este é clínico (Hughes, 1972; Spargo et al., 1976; Sheehan, 1980; Kincaid-Smith, 1991 e Gaber et al., 1994).

5.2. Peso

A distribuição dos animais nos diversos grupos foi realizada de modo aleatório, sendo os pesos médios no início do experimento estatisticamente iguais (tabela 2). A diferença de peso observada no início do período de aclimação (tabela 1), assim como a diferença obtida no ganho de peso durante este período, pode ser explicada pelo fato das ratas não possuírem todas a mesma idade (de nove a doze semanas) e se encontrarem, durante o período de aclimação, em fases distintas de desenvolvimento. Porém, passada esta uma semana, no início do experimento, as ratas, todas jovens, passaram a apresentar pesos estatisticamente iguais, não interferindo, de forma significativa, nos resultados do estudo.

O peso dos animais do grupo prenhe controle foi maior em relação ao seu controle não prenhe no sétimo, décimo quarto e vigésimo dias do experimento (tabelas 3, 4 e 5). Da mesma forma, o ganho de peso das ratas do grupo prenhe controle foi maior que o das não prenhes controle em todos os períodos avaliados (tabelas 7, 8, 9 e 10), exceto no período de aclimação, quando o experimento ainda não tinha sido iniciado (tabela 6).

O peso dos animais do grupo prenhe estresse foi maior em relação aos animais do grupo não prenhe estresse no vigésimo dia do experimento

(tabela 5). As ratas do grupo prenhe estresse ganharam mais peso no período imediatamente anterior (tabela 7) e posterior (tabela 9) ao estímulo estressante crônico, em relação às ratas do grupo não prenhe estresse. No período em que ambos os grupos foram submetidos ao estímulo crônico, as ratas apresentaram perda de peso de maneira similar (tabela 8). Ao longo do experimento, as ratas do grupo prenhe estresse ganharam mais peso que as ratas do grupo não prenhe estresse (tabela 10).

Quando comparados os grupos prenhe estresse e prenhe controle, o primeiro apresentou peso menor no décimo quarto (tabela 4) e no vigésimo dia (tabela 5). O ganho de peso das ratas do grupo prenhe estresse foi menor durante o estímulo (tabela 8) e maior após o final do mesmo (tabela 9), porém, ao final o experimento o ganho total de peso foi menor do que o observado nas ratas do grupo prenhe controle (tabela 10).

5.3. Ganho de peso e estresse

O menor ganho de peso das ratas submetidas ao estímulo crônico provavelmente ocorreu por menor ingestão de ração durante o estímulo. Krebs et al. (1996) verificaram que o estímulo sônico determinou menor ingestão de alimentos, além de aumentar a velocidade de digestão e

freqüência das evacuações. Armário et al. (1983) estudaram as consequências do estímulo sônico e restrição de água em ratos Wistar e concluíram que o estímulo sônico não provoca alteração do peso relativo dos órgãos, mas induz a uma pequena diminuição do ganho de peso. A restrição de água, no entanto, determinou grande redução no ganho de peso corpóreo e no peso relativo do fígado, e aumentou o peso relativo dos outros órgãos em consequência da diminuição da massa corpórea. Van Raaij et al. (1996) não aferiram menor ganho de peso ou menor consumo de ração em ratos submetidos a estímulo sônico de 85 decibéis por 15 minutos por hora, por três semanas. Lesões gástricas foram relatadas em animais submetidos a diversos regimes de estresse (Alican et al., 1996; Nishida et al., 1997; Brzozowski et al., 1997) e que se acentuavam quando a síntese de óxido nítrico era inibida.

5.4. Pressão arterial

Nos dados obtidos, observa-se a diminuição da média da pressão arterial sistólica, no décimo oitavo dia no grupo prenhe controle em relação aos grupos não prenhes, resultado não observado na comparação do grupo prenhe estresse com os grupos não prenhes (tabela 12). O estímulo

estressante crônico do sétimo ao décimo quarto dia do experimento não permitiu a redução da pressão arterial sistólica no grupo prenhe estresse, o que ocorreu normalmente no final da prenhez do grupo controle. Assim, a pressão arterial sistólica dos animais não prenhes, e dos animais do grupo prenhe estresse foram iguais no décimo oitavo dia (tabela 12). Vários mecanismos são propostos para justificar essa alteração. Um dos mecanismos envolvidos está relacionado ao fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), cujo maior componente atualmente reconhecido é o óxido nítrico. Takiuti et al. (1999), ao propor o modelo aqui analisado, verificou em ratas Wistar maior liberação de EDRF em quantidades menores de acetilcolina nas ratas prenhes, em relação ao controle não prenhe. Martins (2004), utilizando o mesmo modelo, observou, em ratas Wistar prenhes, atenuação da resposta pressora à angiotensina II, sendo que tal característica é inibida quando esses animais são submetidos a estresse emocional, resultados concordes com os obtidos no presente estudo, o que justifica a maior pressão arterial aferida no grupo prenhe estresse em relação ao grupo prenhe controle.

Observa-se no grupo prenhe estresse níveis pressóricos sistólico, diastólico e da média das pressões mais elevados no décimo oitavo dia em relação ao grupo prenhe controle (tabela 12). Estes dados sugerem uma

alteração do mecanismo vascular responsável pela vasodilatação durante a prenhez nas ratas submetidas ao estresse crônico.

O ruído, aqui tratado como estímulo sônico, também acarreta elevação da pressão arterial de humanos. As conseqüências de seu excesso, contudo, dependem da resposta individual. Andren et al. (1983) observaram elevação da medida da pressão arterial sistólica e diastólica em 13 pacientes com hipertensão essencial submetidos ao estresse sônico de 100 decibéis durante 10 minutos. Esta alteração decorria do aumento da resistência vascular periférica e da concentração de noradrenalina plasmática. Concluiu-se também que o padrão hemodinâmico de resposta pode variar e ser afetada pelo bloqueio farmacológico de várias partes do sistema nervoso simpático. Com foco sobre o ruído como fator de risco para doenças cardiovasculares, Tomei et al. (1991) verificaram maior prevalência de hipertensão arterial em pessoas expostas a ruídos de maior intensidade por tempo mais longo.

5.5. Imobilização e estresse em ratos

A imobilização consiste num forte estímulo estressante para os animais. Toth (1990) observou que o estresse por imobilização durante 6 horas era letal para a maioria dos ratos pesando cerca de 125 gramas. As

mortes ocorriam após 50 a 60 horas do início do estímulo, independentemente de ter sido interrompido. Encontraram-se nesses ratos severas alterações morfológicas no músculo cardíaco, pulmões e rins. Por sua vez, Liu et al. (1996) identificaram alterações oxidativas em lípidos, proteínas e DNA de cérebros de 8 ratos Sprague-Dawley machos submetidos à imobilização. A partir destes dados, os autores sugeriram que o estresse poderia contribuir com o aparecimento de doenças do envelhecimento, como algumas disfunções cerebrais. Kuriyama et al. (1998) observaram modificações imunológicas em ratos após imobilização durante 6 horas por dia, por 3 dias. O número total de leucócitos foi maior, enquanto as porcentagens de linfócitos e neutrófilos foram, respectivamente, menores e maiores após o primeiro estímulo. As correlações entre a atividade fagocítica e a produção de superóxido pelos neutrófilos, que se mostraram positivas antes do primeiro estímulo, não foram observadas após o primeiro e terceiro estímulos. Estes resultados sugeriam que o estresse por imobilização afeta as defesas individuais e, portanto, suas funções fisiológicas.

No entanto, neste estudo, todas as ratas foram submetidas à imobilização para a medida de pressão arterial caudal de maneira padronizada e, provavelmente, não houve diferença dos parâmetros avaliados entre os grupos devido a este procedimento.

5.6. Repercussões fetais

O estímulo estressante crônico repercutiu significativamente sobre o peso médio dos fetos e suas respectivas placentas (tabela 13). Na tentativa de analisar a proporção do peso de cada placenta, em relação ao feto e encontrar correlação entre estes pesos, obtiveram-se respectivamente a razão de 0,208 e 0,209 para os grupos controle e estresse, ou seja, sem diferença estatística. Esses dados revelam que há manutenção da proporcionalidade dos pesos dos fetos e das placentas no grupo prenhe estresse, conforme observado no grupo controle.

Resultados semelhantes foram obtidos por Yallampalli e Garfield (1993), por meio da inibição da síntese do óxido nítrico, Takiuti et al. (2002), utilizando estímulo estressante sônico e por super-população e Nash et al. (2005), pela inibição da angiogênese em ratas prenhes. Esses autores obtiveram aumento da pressão arterial das ratas prenhes e menor peso fetal nas prenhez das ratas submetidas aos seus respectivos protocolos, em relação aos seus controles. Sharkey et al. (2001), utilizando ratos com propensão para hipertensão e falência cardíaca, concluem que estes animais desenvolvem hipertensão espontânea durante a prenhez, associada com

placentas maiores (com expressão gênica alterada) e recém-nascidos de baixo peso em 36 animais, em relação às 22 ratas do grupo controle. Não se observam, no entanto, alterações histológicas renais, cardíacas, hepáticas ou placentárias.

Ishida et al. (2002) propõem modelo de restrição de crescimento intra-uterino em ratas pela inibição da ornitina descarboxilase. Estes obtiveram, assim, redução do peso fetal, placentário e do DNA placentário. Em estudo sobre a restrição alimentar protéica em ratas prenhes, Fernandez-Twinn et al. (2003) obtiveram recém-nascidos de menor peso nestas ratas em relação ao grupo controle. Vanderlelie et al. (2004), estudando a carência alimentar de selênio, obtiveram menor peso fetal das ratas expostas em relação aos seus controles, o que não se observou em relação ao peso placentário. Bassan et al. (2005) observam que os fetos de ratas espontaneamente hipertensas são mais leves quando comparados com os fetos de ratas Wistar controles, propondo modelo de restrição do crescimento fetal. Em estudo para avaliar os efeitos da redução dos níveis séricos de progesterona em gestação de ratas Wistar por ooforectomia e suplementação parcial do hormônio durante a prenhez, Mark et al. (2006) encontraram redução de peso fetal e placentário nos dias 16 e 22, em relação aos controles.

Em humanos, a correlação epidemiológica entre o estresse durante a gestação e o baixo peso do recém-nascido já é bem conhecida. O crescimento fetal está intimamente ligado às trocas materno-fetais que ocorrem na placenta. Sobre esta consideração, infere-se que seja de grande importância, a manutenção de todos os mecanismos implicados neste delicado processo. Desde a invasão trofoblástica adequada, o suficiente fluxo de sangue à placenta, a integridade da barreira feto placentária até os finos mecanismos deste anexo até hoje pouco conhecido, todos são fundamentais para a ocorrência satisfatória da nutrição fetal e das trocas gasosas materno-fetais. O estresse emocional pode influenciar este processo e, desta forma, o ganho de peso fetal durante a gravidez. Pagel et al. (1990), em estudo com 100 gestantes, por meio de questionários, observaram que eventos estressantes e a ocorrência de quadro ansioso em gestantes estavam correlacionados com menor peso do recém-nascido menores índices de Apgar.

Brandt e Nielsen (1992) observaram, por meio de levantamento realizado na Dinamarca, de 1983 a 1985, em 24.362 gestações, que gestantes que trabalhavam em condições de alta demanda e baixo controle apresentavam risco aumentado para abortamento (com razão de chances = 1,28 e intervalo de confiança de 95%= 1,05–1,57) e partos de recém-

nascidos de baixo peso (com razão de chances = 1,46 e intervalo de confiança de 95% = 1,05–2,04). Por outro lado, em outro estudo realizado com aplicação de questionários no mesmo país, com 5.868 mulheres, Hedegaard et al. (1996) não observaram associação entre os eventos estressantes e risco para recém-nascidos pequenos para idade gestacional. Os mesmos autores, em estudo de mesma metodologia, agora com 8.719 gestantes (Hedegaard et al., 1996A), observaram que os eventos ocorridos entre 16 e 30 semanas de gestação e interpretados pela paciente como altamente estressante estavam associados a maior risco para parto prematuro (com risco relativo = 1,76 e intervalo de confiança de 95% = 1,15-2,71).

Em estudo de coorte longitudinal, realizado por meio de três entrevistas ao longo da gestação na cidade de Jundiaí, Rondó et al. (2003) avaliaram um total de 865 gestações entre 1997 e 2000. Desta forma, concluíram que o estresse na gestação estava associado, em nosso meio, tanto ao baixo peso ao nascimento quanto à prematuridade.

Engel et al. (2005), avaliaram as repercussões sobre a gestação de um dos eventos mais marcantes do início do século XXI, os atentados de 11 de setembro de 2001 ao World Trade Center, em Nova York, que consistiram num sólido exemplo de evento estressante. Eles descreveram o impacto causado por este estímulo em 187 gestantes que moravam ou trabalhavam

nas proximidades à época. Observaram, neste trabalho, o decréscimo da circunferência abdominal dos recém-nascidos com possível influência no desenvolvimento cognitivo futuro.

Com o recente fortalecimento da teoria de Barker et al. (1990), ou seja, da programação intra-uterina de doenças futuras, faz-se necessária a descoberta e adoção de modelos animais que facilitem as pesquisas sobre esse tema. Os modelos envolvendo ratos, devido sua reprodutibilidade e facilidade de execução, conforme já citado, são os mais empregados. Manning et al. (2002) correlacionam o baixo peso ao nascer com a hipertensão futura, em modelo de restrição alimentar protéica materna. Já Styrd et al. (2005) constata a redução da massa de células B pancreáticas na idade adulta de ratos recém-nascidos pequenos, em modelo de hipofluxo placentário cirúrgico. Bassan et al. (2005) observaram, em modelo de restrição do crescimento intra-uterino com ratas espontaneamente hipertensas, retardo do desenvolvimento neurológico de ratos. Tais estudos demonstram a importância do desenvolvimento desses modelos para a compreensão do processo patológico de determinadas doenças relacionadas com eventos intra-útero.

5.7. Considerações sobre o modelo

O modelo aqui estudado alia vários fatores positivos ao seu emprego. Sua facilidade e reprodutibilidade são demonstradas quando os resultados do presente estudo são comparados aos de Takiuti et al. (2002). O fato da placenta de ratos ser do tipo hemocorial e da invasão trofoblástica ser similar à humana (Pijnenborg et al., 1981; Vercruysse et al. 2006) torna mais fácil o emprego do modelo para o entendimento de possíveis processos relacionados à alteração da função placentária.

Em comparação com outros modelos encontrados na literatura, como os que utilizam procedimentos cirúrgicos (Abitbol et al. 1976 e 1976 A, 1977; Alexander et al., 2000; Crews et al., 2000; Mark et al., 2006), administração de substâncias tóxicas e imunomoduladoras (Yallampalli et al., 1993; Faas et al., 1994; Ishida et al., 2002; Nash et al., 2005) e o frio (Kanayama et al., 1997) o presente modelo é menos agressivo.

O ruído, aqui empregado, é agente estressor de alta relevância ambiental e clínica. Ademais, o ruído parece ser agente estressor suave em relação à ativação neuroendócrina (de Boer et al., 1989). O nexos causal, assim como o observado em estudos epidemiológicos de Rofe e Goldberg

(1983) e Engel (2005) é facilmente obtido entre o estímulo estressante empregado e as alterações observadas.

Os resultados obtidos no presente estudo estão concordes aos observados nos estudos epidemiológicos – estresse e pré-eclâmpsia (Rofe e Goldberg, 1983; Klebanoff et al., 1990; Eskenazi et al., 1991; Saurel-Cubizolles et al., 1991; Landsbergis e Hatch, 1996; Klonoff-Cohen et al., 1996; Wergeland e Strand, 1997) e estresse e baixo peso ao nascer (Pagel et al., 1990; Brandt e Nielsen, 1992; Hedegaard et al., 1996; Hedegaard et al., 1996A; Rondó et al., 2003).

Outro fator importante que leva ao emprego do modelo é a possibilidade de estudo dos recém-nascidos, seu desenvolvimento e o aparecimento de doenças futuras, uma vez que os animais são de fácil obtenção, manutenção e reprodução e de crescimento rápido.

Há muito, no entanto, a ser respondido sobre outros possíveis efeitos dos estímulos utilizados. Sabe-se que o estímulo sônico empregado, de 100 decibéis, pode ser lesivo aos aparelhos auditivos maternos e fetais, podendo levar também a distúrbios do sono (Passchier-Vermeer, 1993) em humanos. Ainda em humanos, a alta intensidade de ruído tem sido associada a efeitos na saúde de adultos, incluindo perda de audição e aumento dos níveis pressóricos (Committee on Environmental Health, 1997). É descrito em

ovelhas que o som é bem transmitido intra-útero (Gehardt et al., 1990), porém poucos são os estudos que avaliam a repercussão do ruído intra-útero e alterações neonatais. Em crianças entre quatro e dez anos de idade com perda auditiva para sons de alta frequência, há associação com exposição pré-natal a ruído ocupacional materno de 85 a 95 decibéis (Lalande et al., 1986). Em animais, demonstrou-se aumento da sensibilidade da cóclea em desenvolvimento a lesões induzidas por ruído (Lenoir e Pujol, 1980), porém este efeito não foi comprovado em humanos (Douek et al., 1976). Ainda em animais de experimentação, estímulos sonoros podem levar a alterações comportamentais (Segal et al., 1989), modificações do sistema hemodinâmico (Engeland et al., 1990; Takiuti et al., 2002) e mudanças no equilíbrio neuroendócrino (De Boer et al., 1989). Efeitos teratogênicos também foram demonstrados em animais expostos ao ruído intra-útero (Murata et al., 1993). Em macacos Rhesus, houve níveis persistentes de cortisol e corticotropina em recém-nascidos expostos intra-útero em relação aos não expostos (Clarke et al., 1994), além de comportamento anti-social anormal (Clarke e Schneider, 1993). Em ratos, houve elevação no nível sérico de corticosterona e comportamento neonatal anormal (Weinstock et al., 1992). Até que ponto os estímulos empregados afetam os fetos e seus

posteriores desenvolvimentos neuropsicomotor e de que modo interferem no desenvolvimento de doenças futuras ainda são questões a serem respondidas.

Considerando a maior profundidade da invasão trofoblástica intersticial e endovascular em ratos, este animal é apropriado para modelo quando considerada a invasão profunda que ocorre em humanos. Outro ponto sobre o qual se deve ponderar é que a placentação dos ratos, embora seja hemocorial, ocorre em tempo diferente da humana. A invasão gradual das células trofoblásticas aumenta no décimo-quinto dia da prenhez e tem seu pico no décimo-oitavo dia numa gestação que dura vinte e dois dias. Em humanos, a invasão intersticial profunda precede o aparecimento do trofoblasto endovascular no miométrio (Vercruysse et al., 2006).

Por fim, os estímulos estressantes para ratos podem não equivaler a estímulos estressantes em humanos, e vice-versa, assim como a gradação de intensidade de resposta ao fator desencadeante de estresse, caso causem esta resposta. Assim, pode ser que o estímulo sônico e o de super-população em humanos não desencadeie resposta estressante tão intensa, ou até não a cause.

5.8. Considerações Finais

O importante para o desenvolvimento e emprego do presente modelo é saber que os resultados obtidos, como a perda de peso durante o período exposto ao estresse, a maior medida de pressão arterial caudal, presença de maior proteinúria (Takiuti et al., 2002) e o menor peso fetal-placentário são decorrentes do estar (ou ter sido) submetido aos estímulos, estabelecendo tal nexos causal. Os futuros estudos sobre o modelo analisado deverão ter como foco tentar esclarecer os pontos ainda sem resposta conclusiva.

Desta maneira, podemos concluir que o estímulo estressante crônico em ratas prenhes, representados neste estudo pela superpopulação e pelo estímulo sônico, não acarretou alterações histológicas renais à microscopia óptica. No entanto, o modelo analisado pode ser para simular a restrição do crescimento intra-uterino humano de provável etiologia hipertensiva. Este modelo possibilita a investigação dos mecanismos de lesão vascular placentária mediados pela hipertensão, o mecanismo que medeia os efeitos perinatais no desenvolvimento dos recém-nascidos e oferece meios de avaliação pré-clínica de tratamentos preventivos futuros.

6 Conclusões

A partir dos dados obtidos neste estudo, a partir de modelo experimental para estudar os efeitos do estresse em gestação de ratas, pode-se concluir que:

1. Não houve diferença histológica à microscopia óptica entre rins de ratas prenhes ou não prenhes submetidas ao estresse sônico, quando comparados aos seus controles;
- 2.a. As ratas dos grupos não prenhe e prenhe perderam peso durante o período ao qual foram submetidas ao estresse.
- 2.b. As ratas dos grupos não prenhe estresse e prenhe estresse ganharam mais peso em média nos sete dias após o final do estímulo estressante que seus controles.
- 2.c. A média de peso das ratas prenhes submetidas ao estresse no final do experimento, assim como sua média de ganho de peso, foi estatisticamente menor que a observada no grupo prenhe controle.
- 2.d. As médias de pressão arterial caudal sistólica, diastólica, assim como da média das pressões finais das ratas prenhes submetidas ao estresse foram estatisticamente maiores do que as do grupo prenhe controle.
3. As médias dos pesos dos fetos e das placentas do grupo prenhe estresse são estatisticamente menores que as do grupo prenhe controle, podendo, o modelo avaliado ser utilizado como modelo experimental para restrição do crescimento intra-uterino.

Anexo 1 – Peso (em gramas) dos animais do grupo não prenhe controle nos cinco diferentes períodos.

	PIA	P1	P2	P3	P4
RATA 1	229	240	241	258	258
RATA 2	224	235	245	252	251
RATA 3	204	206	215	228	228
RATA 4	221	221	232	250	251
RATA 5	224	225	221	233	241
RATA 6	220	230	234	251	257
RATA 7	256	275	242	255	260
RATA 8	236	247	266	285	285
RATA 9	232	246	255	272	280
RATA 10	240	257	273	274	285

Anexo 2 – Peso (em gramas) dos animais do grupo não prenhe estresse nos cinco diferentes períodos.

	PIA	P1	P2	P3	P4
RATA 1	231	240	235	232	249
RATA 2	224	235	242	235	243
RATA 3	230	241	250	243	248
RATA 4	233	238	262	250	262
RATA 5	254	254	263	254	256
RATA 6	228	244	284	262	276
RATA 7	223	225	241	229	232
RATA 8	248	258	269	238	277
RATA 9	228	228	241	207	233
RATA 10	230	231	235	210	243

Anexo 3 – Peso (em gramas) dos animais do grupo prenhe controle nos cinco diferentes períodos.

	PIA	P1	P2	P3	P4
RATA 1	202	217	248	274	316
RATA 2	221	235	250	286	348
RATA 3	212	233	256	296	344
RATA 4	220	236	261	296	328
RATA 5	223	236	272	310	341
RATA 6	210	248	291	335	372
RATA 7	229	233	276	300	349
RATA 8	238	235	266	292	328
RATA 9	209	236	273	315	352
RATA 10	189	214	256	298	338

Anexo 4 – Peso (em gramas) dos animais do grupo prenhe estresse nos cinco diferentes períodos.

	PIA	P1	P2	P3	P4
RATA 1	218	236	257	259	310
RATA 2	244	251	265	259	314
RATA 3	210	221	254	249	268
RATA 4	212	237	259	237	290
RATA 5	222	235	262	238	282
RATA 6	260	267	305	269	359
RATA 7	228	228	262	226	305
RATA 8	228	229	259	237	307
RATA 9	213	227	257	250	300
RATA 10	226	235	272	247	321

Anexo 5 – PA inicial e final (em mmHg) de cada rata do grupo não prenhe controle.

	PAS 1	PAD 1	PAM 1	PAS 2	PAD 2	PAM 2
RATA 1	150	105	120	151	73	99
RATA 2	160	108	106	156	97	116
RATA 3	141	94	109	124	81	95
RATA 4	135	78	97	161	107	125
RATA 5	156	106	122	151	91	111
RATA 6	142	80	96	150	76	100
RATA 7	147	80	102	152	86	108
RATA 8	142	83	102	146	98	114
RATA 9	143	82	102	132	83	99
RATA 10	146	87	106	147	99	115

Anexo 6 – PA inicial e final (em mmHg) de cada rata do grupo não prenhe estresse.

	PAS 1	PAD 1	PAM 1	PAS 2	PAD 2	PAM 2
RATA 1	150	86	107	156	98	117
RATA 2	144	88	105	130	78	95
RATA 3	144	74	97	149	75	99
RATA 4	157	90	100	142	79	100
RATA 5	137	89	105	151	91	111
RATA 6	153	87	109	152	83	106
RATA 7	145	91	108	157	97	117
RATA 8	151	91	111	155	107	123
RATA 9	143	88	106	143	98	120
RATA 10	154	92	112	154	92	100

Anexo 7 – PA inicial e final (em mmHg) de cada rata do grupo prenhe controle.

	PAS 1	PAD 1	PAM 1	PAS 2	PAD 2	PAM 2
RATA 1	149	78	101	131	62	85
RATA 2	156	94	113	125	60	81
RATA 3	138	97	110	121	60	80
RATA 4	146	82	103	133	98	109
RATA 5	172	116	134	154	98	116
RATA 6	165	112	129	116	82	93
RATA 7	124	71	88	145	112	123
RATA 8	130	62	88	134	83	100
RATA 9	138	88	104	120	74	89
RATA 10	124	90	101	112	70	84

Anexo 8 – PA inicial e final (em mmHg) de cada rata do grupo prenhe estresse.

	PAS 1	PAD 1	PAM 1	PAS 2	PAD 2	PAM 2
RATA 1	155	57	89	179	115	136
RATA 2	141	77	98	166	100	122
RATA 3	148	94	112	153	99	117
RATA 4	135	84	92	152	105	120
RATA 5	148	97	92	172	99	123
RATA 6	139	77	97	144	87	104
RATA 7	152	108	122	138	89	102
RATA 8	160	94	116	158	104	124
RATA 9	164	90	114	142	90	193
RATA 10	147	92	110	140	92	108

Anexo 9 – Número de fetos por prenhez por rata dos grupos PC e PE.

	PC	PE
RATA 1	15	15
RATA 2	13	13
RATA 3	16	12
RATA 4	13	11
RATA 5	13	8
RATA 6	17	12
RATA 7	16	19
RATA 8	15	17
RATA 9	12	12
RATA 10	13	16
TOTAL	143	135

Anexo 10 – Médias dos pesos (em gramas) dos fetos por prenhez por rata $\pm$ desvio padrão.

	PC	PE
RATA 1	2,48 $\pm$ 0,17 (15)	2,84 $\pm$ 0,23 (15)
RATA 2	4,02 $\pm$ 0,22 (13)	2,71 $\pm$ 0,29 (13)
RATA 3	2,72 $\pm$ 0,14 (16)	2,44 $\pm$ 0,26 (12)
RATA 4	2,66 $\pm$ 0,31 (13)	2,52 $\pm$ 0,18 (8)
RATA 5	2,90 $\pm$ 0,25 (13)	1,96 $\pm$ 0,36 (12)
RATA 6	2,62 $\pm$ 0,15 (17)	2,52 $\pm$ 0,17 (19)
RATA 7	2,54 $\pm$ 0,16 (16)	2,53 $\pm$ 0,15 (17)
RATA 8	2,74 $\pm$ 0,18 (15)	2,80 $\pm$ 0,17 (15)
RATA 9	3,65 $\pm$ 0,15 (12)	2,58 $\pm$ 0,21 (12)
RATA 10	3,48 $\pm$ 0,20 (15)	2,39 $\pm$ 0,15 (16)

Anexo 11 – Médias dos pesos das placentas (em gramas) por prenhez por rata $\pm$ desvio padrão.

	PC	PE
RATA 1	0,64 $\pm$ 0,05 (15)	0,63 $\pm$ 0,08 (15)
RATA 2	0,63 $\pm$ 0,07 (13)	0,58 $\pm$ 0,06 (13)
RATA 3	0,62 $\pm$ 0,08 (16)	0,44 $\pm$ 0,06 (12)
RATA 4	0,62 $\pm$ 0,07 (13)	0,55 $\pm$ 0,04 (8)
RATA 5	0,62 $\pm$ 0,07 (13)	0,41 $\pm$ 0,10 (12)
RATA 6	0,55 $\pm$ 0,06 (17)	0,60 $\pm$ 0,07 (19)
RATA 7	0,53 $\pm$ 0,09 (16)	0,47 $\pm$ 0,04 (17)
RATA 8	0,58 $\pm$ 0,04 (15)	0,52 $\pm$ 0,06 (15)
RATA 9	0,63 $\pm$ 0,07 (12)	0,54 $\pm$ 0,08 (12)
RATA 10	0,58 $\pm$ 0,08 (15)	0,52 $\pm$ 0,05 (16)

Anexo 12 – Comparação da distribuição de número de fetos por peso aproximado entre grupo prenhe controle e estresse. Os pesos estão expressos em gramas.

Anexo 13 – Comparação da distribuição de número de placentas por peso aproximado entre grupo prenhe controle e estresse. Os pesos estão expressos em gramas.

Anexo 14 – Correlação entre os pesos de cada feto, em gramas, e sua respectiva placenta do grupo prenhe controle.

Anexo 15 – Correlação entre os pesos de cada feto, em gramas, e sua respectiva placenta do grupo prenhe estresse.

No grupo estresse, o teste de significância T (anexo 20) para análise do coeficiente de correlação (r) também aponta correlação entre os parâmetros ($p < 0,001$), ou seja, quanto maior o peso placentário, maior o peso fetal, porém a regressão linear não é estatisticamente significativa ($p = 0,08$).

8 Referências

Abitbol MM, Gallo GR, Pirani CL, Ober WB. Production of experimental toxemia in the pregnant rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1976;124:460-70.

Abitbol MM, Facog MD, Pirani CL, Ober WB, Driscoll SG, Cohen MW. Production of experimental toxemia in the pregnant dog. *Am J Obstet Gynecol* 1976A;48:537-48.

Abitbol MM, Ober WB, Gallo GR, Driscoll SG, Pirani CL. Experimental toxemia of pregnancy in the monkey, with a preliminary report on renin and aldosterone. *Am J Pathol* 1977;86:573-583.

Abitbol MM, Facog MD. Aortic compression and uterine blood flow during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1977A;50:562-70.

Alexander BT, Kassab SE, Miller MT, Abram SR, Reckelhoff JF, Bennett WA, Granger JP. Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 2000;37:1191-5.

Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA, Granger JP. Preeclampsia: linking placental ischemia with cardiovascular-renal dysfunction. *News Physiol Sci* 2001;16:282-6.

Alican I, Peker O, Kurtel H. Cold restraint stress-induced gastric mucosal dysfunction. Role of nitric oxide. Coskun T, Yegen Bc. *Dig Dis Sci* 1996;41:956-63.

Andren L, Hansson L, Eggertsen R, Hedner T, Kalbelg BE. Circulatory effects of noise. *Acta Med Scand* 1983;213:31-5.

Armario A, Montero JJ, Pla-Giribert T, Vivas C, Balasch J. Effect of chronic noise or water restriction on weight of body and organs in the rat. *Rev Exp Fisiol* 1983;39:267-70.

Artazcoz L, Escriba-Aguir V, Cortes I. Stress in a changing society. *Gac Sanit* 2006;20:71-8.

Auroux M. Capabilities and limitations of research. *Bull Acad Natl Med* 1995;179:1729-41.

Bakoush O, Tencer J, Torffvit O, Tenstad O, Skogvall I, Rippe B. Increased glomerular albumin permeability in old spontaneously hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1724-31.

Bale TL. Is mom too sensitive? Impact of maternal stress during gestation. *Front Neuroendocrinol* 2005;26:41-49.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br Med J* 1990;301:259-62.

Bassan H, Bassan M, Pinhasov A, Kariv N, Giladi E, Gozes I, Harel S. The pregnant spontaneously hypertensive rat as a model of asymmetric intrauterine growth retardation and neurodevelopmental delay. *Hypertens Preg* 2005;24:201-11.

Berkowitz GS, Kasl SV. The role of psychosocial factors in spontaneous preterm delivery. *J psychosom Res* 1983;27:283-90.

Brandt LP, Nielsen CV. Job stress and adverse outcome of pregnancy: a causal link or recall bias? *Am J Epidemiol* 1992;135:302-11.

Brzozowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, Drosdowicz D, Zaczek M, Kedra D. Role of l-arginine, a substrate for nitric oxide-synthase, in gastroprotection and ulcer healing. *J Gastroenterol* 1997;32:442-52.

Burton WN, Chen CY, Conti DJ, Schultz AB, Pransky G, Edington DW. The association of health risks with on-the-job productivity. *J Occup Environ Med* 2005;47:769-77.

Cannon WB. Stresses and strains of homeostasis. *Am J Med Sci* 1935;89:1-14.

Cavanagh D, Rao PS, Tung KSK, Gaston L. Eclamptogenic toxemia: the development of an experimental model in the subhuman primate. *Am J Obstet Gynecol* 1974;120:183-96.

Christensen T, Klebe JG, Bertelsen V, Hansen HE. Changes in renal volume during normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989;68:541-3.

Clarke AS, Schneider ML. Prenatal stress has long-term effects on behavioral responses to stress in juvenile rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* 1993;26:293-304.

Clarke AS, Wittwer DJ, Abbott DH, Schneider ML. Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* 1994;27:257-69.

Colomina MT, Roig JL, Torrente M, Vicens P, Domingo JL. Neurotox Teratol 2005;27:565-74.

Committee on Environmental Health. Noise: a hazard for the fetus and newborn. *Pediatrics* 1997;100:724-7.

Crews J, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension* 2000;35:71-6.

Cushway D, Tyler PA, Nolan P. Development of a stress scale for mental health professionals. *Br J Clin Psychol* 1996;35:279-95.

D'Atri DA, Fitzgerald EF, Kasl SK, Ostfeld AM. Crowding in prison: the relationship between changes in housing mode and blood pressure. *Psychosom Med* 1981;43:95-105.

De Boer SF, Van der Gugten J, Slangen JL. Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol Behav* 1989;45:789-795.

De Weerth C, Buitelaar JK. Physiological stress reactivity in human pregnancy – a review. *Neur Biobehav Rev* 2005;29:295-312.

Douek E, Dodson HC, Bannister LH, Ashcroft P, Humphries KN. Effects of incubator noise on the cochlea of the newborn. *Lancet* 1976;20:1110-3.

Eder DJ, McDonald MT. A role for brain angiotensin II in experimental pregnancy-induced hypertension in laboratory rats. *Clin Exper Hyper Pregnancy* 1988;3:431-451.

Engel SM, Berkowitz GS, Wolff MS, Yehuda R. Psychological trauma associated with the World Trade Center Attacks and its effect on pregnancy outcome. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2005;19:334-41.

Engeland WC, Millar P, Dann DS. Pituitary-adrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs. *Am J Physiol* 1990; 258:672-7.

Eskenazi B, Fenster L, Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA* 1991;266:237-41.

Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:158-64.

Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B, Hales CN. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr* 2003;90:815-22.

Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine* 1981;60:267-76.

Fraley RC, Fazzari DA, Bonanno GA, Dekel S. Attachment and psychological adaptation in high exposure survivors of the September 11th attack on the World Trade Center. *Pers Soc Psychol Bull* 2006;32:538-51.

Friedman R, Dahl LK. The effect of chronic conflict on the blood pressure of rats with a genetic susceptibility to experimental hypertension. *Psychosom Med* 1975;37:402-16.

Fujino Y, Mizoue T, Tokui N, Yoshimura T. Prospective cohort study of stress, life satisfaction, self-rated health, insomnia, and suicide death in Japan. *Suicide Life Threat Behav* 2005;35:227-37.

Gaber LW, Spargo BH, Lindheimer MD. Renal pathology in pre-eclampsia. *Baill Clin Obstet Gynaecol* 1994;8:443-68.

Gehardt KJ, Abrams RM, Oliver CC. Sound environment of the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:282-7.

Giscombe CL, Lobel M. Explaining disproportionately high rates of adverse birth outcomes among African Americans: the impact of stress, racism, and related factors in pregnancy. *Psychol Bull* 2005;131:662-83.

Godfrey R, Julien M. Urbanisation and health. *Clin Med* 2005;5:137-41.

Hartikainen-Sorri AL, Kirkinen P, Sorri M, Anttonen H, Tuimala R. No effect of experimental noise exposure on human pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991;77:611-5.

Heaman MI, Blanchard JF, Gupton AL, Moffatt ME, Currie RF. Risk factors for spontaneous preterm birth among Aboriginal and non-Aboriginal women in Manitoba. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2005;19:181-93.

Hedegaard M, Henriksen TB, Sabroe S, Secher NJ. The relationship between psychological distress during pregnancy and birth weight for gestational age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:32-9.

Hedegaard M, Henriksen TB, Secher NJ, Hatch MC, Sabroe S. Do stressful life events affect duration of gestation and risk of preterm delivery? *Epidemiology* 1996A;7:339-45.

Henry JP. Biological Basis of the stress response. *Integrative Physiol Behav Sci* 1991;27:66-83.

Hildingh C, Luepker RV, Baigi A, Lidell E. Stress, health complaints and self-confidence: a comparison between young adult women in Sweden and USA. *Scand J Caring Sci* 2006;20:202-8.

Hughes EC. *Obstetric-gynecologic terminology*. Philadelphia: Davis, p. 422-3; 1972.

Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull* 2004;130:115-42.

Ishida M, Hiramatsu Y, Masuyama H, Mizutani Y, Kudo T. Inhibition of placental ornithine decarboxylase by DL-alpha-difluoro-methyl ornithine causes fetal growth restriction in rat. *Life Sci* 2002;70:1395-405.

Kahhale S. *Biópsia renal nas síndromes hipertensivas na gravidez: experiência de 15 anos [dissertation]*. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1996.

Kanayama N, Khatun S, Belayet H, She L, Terao T. Chronic local cold stress to the soles induces hypertension in rats. *Am J Hypertens* 1999;12:1124-9.

Kanayama N, Tsujimura R, She L, Maehara K, Terao T. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats. *J Hypertens* 1997;15:383-9.

Khatun S, Kanayama N, Belayet HM, Masui M, Sugimura M, Kobayashi T, Terao T. Induction of preeclampsia like phenomena by stimulation of sympathetic nerve with cold and fasting stress. *Eur J Obstet Gynecol* 1999;86:89-97.

Kincaid-Smith P. The renal lesion of preeclampsia revisited. *Am J Kidney Dis* 1991;17:144-8.

Kita A. Quality of social network for pregnant women in Japan with focus on parity and family structure. *Kobe J Med Sci* 2000;46:125-36.

Klebanoff MA, Shiono PH, Rhoads GG. Outcomes of pregnancy in a national sample of resident physicians. *N Engl J Med* 1990;323:1040-5.

Klonoff-Cohen HS, Cross JL, Pieper CF. Job stress and preeclampsia. *Epidemiology* 1996;7:245-9.

Kobashi G. Genetic and environmental factors associated with the development of hypertension in pregnancy. *J Epidemiol* 2006;16:1-8.

Krebs H, Macht M, Weyers P, Weijers HG, Janke W. Effects of stressful noise on eating and non-eating behavior in rats. *Appetite* 1996;26:193-202.

Kuriyama T, Oishi K, Kakazu H, Machida K. Changes of physiological functions in rats induced by immobilization stress. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 1998;52:647-53.

Lalande NM, Hetu R, Lambert J. Is occupational noise exposure during pregnancy a risk factor of damage to the auditory system of the fetus? *Am J Ind Med*, 1986;10:427-35.

Landsbergis PA, Hatch MC. Psychosocial work stress and pregnancy-induced hypertension. *Epidemiology* 1996;7:346-51.

Lawler JE, Barker GF, Hubbard JW, Schaub RG. Effects of stress on blood pressure and cardiac pathology in rats with borderline hypertension. *Hypertension* 1981;3:496-505.

Lenoir M, Pujol R. Sensitive period for acoustic trauma in the rat pup cochlea: histological findings. *Acta Otoralyngol* 1980;89:317-22.

Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 1996;10:1532-8.

Lohlein M. apud Kincaid-Smith PS, Fairley KF. Pathophysiological Mechanisms and pathology in hypertensive disorders of pregnancy. In: *The kidney and hypertension in pregnancy*. New York: Churchill Livingstone 1993;25-36.

Lu BY. Changes of selenium in patients with pregnancy induced hypertension. *Chin J Obst Gynec* 1990;25:325.

Lupton MG, Williams DJ. The ethics of research on pregnancy women: is maternal consent sufficient? *BJOG* 2004;111:1307-12.

Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:202-6.

Mandavilli A. Monkey business. *Nat Med* 2006;12:266-7.

Marchand A, Durand P, Demers A. Work and mental health: the experience of the Quebec workforce between 1987 and 1998. *Work* 2005;25:135-42.

Marcoux S, Brisson J, Fabia J. The effect of leisure time physical activity on the risk of pre-eclampsia and gestational hypertension. *J Epidemiol Community Health* 1989;43:147-52.

Mark PJ, Smith JT, Waddell BJ. Placental and fetal growth tetardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. *Placenta* 2006;27:208-14.

Martins FA. Resposta pressora à angiotensina II e expressão do RNA mensageiro dos seus receptores em ratas prenhes submetidas a estresse [dissertation]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2004.

Meehan JP, Fineg J, Mosely JD. The effects of restraint and training on the arterial pressure of the immature chipamzee. *Fed Proc* 1964;23:515-21.

Mihailovic M, Cvetkovic M, Ljubic A, Kosanovic M, Nedeljkovic S, Jovanovic I, Pesut O. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol Trace Elem Res* 2000;73:47-54.

Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996;20:15-27.

Murata M, Takigawa H, Sakamoto H. Teratogenic effects of noise and cadmium in mice: does noise have teratogenic potential? *J Toxicol Environ Health* 1993;1993;39:237-45.

Nandi A, Galea S, Tracy M, Ahern J, Resnick H, Gershon R, Vlahov D. Job loss, unemployment, work stress, job satisfaction, and the persistence of posttraumatic stress disorder one year after the September 11 attacks. *J Occup Environ Med* 2004;46:1057-64.

Nash P, Wentzel P, Lindeberg S, Naessen T, Jansson L, Olovsson M, Eriksson UJ. Placental dysfunction in Suramin-treated rats – a new model for pre-eclampsia. *Placenta* 2005;26:410-8.

Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthases in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:275-9.

Nisell H, Larsson G, Wager J. The relation between life stress and hypertensive complications during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989;68:423-7.

Oppenheim GB. Psychological disorders in pregnancy. In *Psychological disorders in obstetrics and gynecology*. First edition, pages 93-146, Butterworth & Co (Publishers) 1985, Garden City Press Ltd, Letchworth, Herts, London, England.

Packham DK, Mathews DC, Fairley KF, Whitworth JA, Kincaid-Smith PS. Morphometric analysis of pre-eclampsia in women biopsied in pregnancy and post-partum. *Kidney Int* 1988;34:704-11.

Pagel MD, Smilkstein G, Regen H, Montano D. Psychosocial influences on new born outcome: a controlled prospective study. *Soc Sci Med* 1990;30:597-604.

Palmer AE, London WT, Sly DL, Rice JM. Spontaneous preeclamptic toxemia of pregnancy in the patas monkey. *Lab Anim Sci* 1979;29:102-6.

Passchier-Vermeer W. Noise and health. The Hague: Health Council of Netherlands 1993;A93/02.

Pijnenborg R, Robertson WR, Brosens I, Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981;2:71-92.

Pollack VE, Nettles JB. The kidney in toxemia of pregnancy: a clinical and pathological study based on renal biopsies. *Medicine* 1960;39:469-526.

Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, Caton JS, Redmer DA. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 2005;26:689-708.

Rofe Y, Goldberg J. Prolonged exposure to a war environment and its effects on the blood pressure of pregnant women. *Br J Med Psychol* 1983;56:305-1.

Rondó PHC, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MCN, Lobert H, Artes R. Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:266-72.

Saurel-Cubizolles MJ, Kaminski M, Du Mazaubrun C, Llado J, Estryn-Behar M. High blood pressure during pregnancy and working conditions among hospital personnel. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;40:29-34.

Schwartz JI. A study of the relation between maternal life change events and premature delivery. In *Vulnerable infants: a psychosocial dilemma* (Edited by Schwartz JI, Schwartz LH) 1977; New York:Mcgraw-Hill, 47-61.

Segal DS, Kuczenski R, Swick D. Audiogenic stress response: behavioral characteristics and underlying monoamine mechanisms. *J Neural Transm* 1989;75:31-50.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936;138:32. In *J Neuropsych* 1998;10:230-1.

Sharkey LC, McCune SA, Yuan O, Lange C, Fray J. Spontaneous pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth restriction in rats. *Am J Hypertens* 2001;14:1058-66.

Sheehan HL. Renal morphology in preeclampsia. *Kidney Int* 1980;18:241-52.

Spargo B, Lichtig C, Luger AM, Katz AI, Lindheimer MD. The renal lesion in preeclampsia. In: Lindheimer MD, Katz AI, Zuspan FP. *Hypertension in pregnancy*. New York: John & Sons; 1980:129-37.

Spargo B, McCartney CP, Winemiller R apud Gärtner HV, Sammoun A, Wehrmann, Grossmann T, Junghans R, Weihing C. Preeclamptic nephropathy – an endothelial lesion. A morphological study with a review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol* 1998;77:11-27.

Strevens H, Wide-Swensson D, Hansen A, Horn T, Ingemarsson I, Larsen S, Willner J, Olsen S. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and preeclampsia. *BJOG* 2003;110:831-6.

Styrud J, Ericsson UJ, Grill V, Swenne I. Experimental intrauterine growth retardation in the rat causes a reduction of pancreatic B-cell mass, which persists into adulthood. *Biol Neonate* 2005;88:122-8.

Syme SL, Berkman LF. Social class, susceptibility and sickness. *Am J Epidemiol* 1976;104:1-8.

Takeda Y, Kawachi I, Yamagata Z, Hashimoto S, Matsumura Y, Oguri S, Okayama A. Multigenerational family structure in Japanese society: impacts on stress and health behaviors among women and men. *Soc Sci Med* 2004;59:69-81.

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress in pregnancy: a new wistar rat model for human preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:544-50.

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress-related preeclampsia: an evolutionary maladaptation in exaggerated stress during pregnancy? *Med Hypotheses* 2003;60:328-31.

Theorell T, Karasek RA. Current issues relating to psychosocial job strain and cardiovascular disease research. *J Occup Health Psychol* 1996;1:9-26.

Tomei F, Tomao E, Papaleo B, Baccolo TP, Alfi P. Study of some cardiovascular parameters after chronic exposure to noise. *Int J Cardiol* 1991;33:393-400.

Toth T. The role of catecholamines in lethal immobilization stress. *Acta Physiol Hung* 1990;75:95-9.

Troisi A. Gender differences in vulnerability to social stress: a Darwinian perspective. *Physiol Behav* 2001;73:443-9.

Vanderlelie J, Venardos K, Perkins AV. Selenium deficiency as a model of experimental pre-eclampsia in rats. *Reprod* 2004;128:635-41.

Van Raaij MTM, Oortgiesen M, Timmerman HH, Dobbe CJG, Van Loveren H. Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiol Behav* 1996;60:1527-33.

Verkruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the deciduas and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 2006;27:22-33.

Vezina M, Derriennic F, Monfort C. The impact of job strain on social isolation: a longitudinal analysis of French workers. *Soc Sci Med* 2004;59:29-38.

Weistock M, Matlina E, MAor GI, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in the female rat. *Brain Res* 1992;13:195-200.

Wergeland E & Strand K. Work pace control and pregnancy health in a population-based sample of employed women in Norway. *Scand J Work Environ Health* 1998;24:206-12.

Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169: 1316-20.

Zugaib M, Bittar RE, editores. *Protocolos Assistenciais – Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da USP*. 2ª ed. São Paulo: Ateneu; 2003.