

Efeitos do estresse induzido por imobilização na prenhez da rata**Suzana de Fatima Paccola Mesquita¹, Mariana Nicolielo¹, Mainara Ferreira Barbieri¹,
Beatriz Thiemi Michiyori¹, Elaine Regina da Silva¹, Marianne Orlandini Klein¹, Josiane
de Lima Rosa¹, Marília Martins Cavariani¹ & Isabel Cristina Cherici Camargo²**

¹ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral. Campus Universitário-Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, CEP 86051-990, Caixa Postal 6001. Londrina-PR, Brasil. email: mesquita@uel.br.

² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Assis-São Paulo, Brasil.

Abstract. Effects of immobilization-induced stress on pregnant rats. The stress is a social problem. The exposure of pregnant rats to stress can cause maternal physiological and behavioral changes. The purpose of this work was investigate the stress effect on the reproductive performance in Wistar rats submitted to immobilization from the first to the 20th day of gestation. The day on which spermatozoa were found in the vaginal smear was considered as day 0 of gestation. The pregnant rats were individually caged and randomly distributed in two groups; control group: animals without immobilization-induced stress and experimental group: animals submitted to immobilization induced-stress 1 hour/day, inside a contensor (PVC tube). Following treatment the maternal body weight gain, pre and post-implantation loss, mean of live fetuses, reabsorption index, intrauterine deaths, as well as fetal and placental mean weight were evaluated. The number of corpora lutea, implantations and reabsorptions was counted. Besides the percentage of adequate (AGA), small (SGA) and large (LGA) newborn related to gestational age was evaluated. The results showed increased number of total reabsorption as well as body fetal weight and number of life fetus reduction. All the newborns were small to gestation age (SGA). The immobilization-induced stress on pregnant rats interfere both with performance reproductive in rats and with fetal developmental.

Key words: stress, immobilization, reproductive performance, pregnancy, rat.

Resumo. O estresse é um fator social preocupante que leva a alterações maternas, tanto fisiológicas como comportamentais. A proposta deste estudo foi investigar os efeitos do estresse no desempenho reprodutivo de ratas Wistar, submetidas à imobilização do primeiro ao 20º dia de prenhez. O dia no qual o espermatozóide foi encontrado no esfregaço vaginal foi considerado o dia 0 de gestação. As ratas prenhes foram colocadas em gaiolas individualizadas e aleatoriamente distribuídas em dois grupos; grupo controle: animais não submetidos à indução de estresse por imobilização; grupo experimental: animais submetidos ao estresse por imobilização, 1h/dia, dentro de um contensor (tubo de PVC). Após o tratamento obtiveram-se registros do ganho de peso materno, perdas pré e pós-implantações, média de fetos vivos, índice de reabsorções, mortes intra-uterinas, assim como, peso médio dos fetos e das placentas. O número de corpos lúteos, implantações e reabsorções foi contado. Além disso, foi avaliado o percentual de recém-nascidos pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes (GIP) para a idade gestacional. Os resultados mostraram aumento no número de reabsorções assim como redução no peso fetal e no número de fetos vivos. Todos os recém-nascidos foram pequenos para a idade gestacional (PIP). O estresse induzido por imobilização em ratas prenhes, interfere tanto no desempenho reprodutivo das ratas como no desenvolvimento fetal.

Palavras-chave: estresse, imobilização, desempenho reprodutivo, gestação, rato.

INTRODUÇÃO

Todos os animais respondem a estímulos como manipulação física e traumas, com diferentes componentes de ordem neural, humoral ou metabólica visando a manutenção ou a reposição da homeostase. As alterações impostas por estes estímulos são geralmente denominadas como respostas ao estresse (WAGNER, 1991).

O estresse pode ser definido como uma reação do organismo a forças deletérias e que, geralmente, se manifestam por alterações neuroendócrinas ou adrenocorticais. O estresse em animais pode ser considerado de dois tipos: o estresse mental, o qual pode ser desencadeado por um meio-ambiente hostil ou não familiar; e o estresse físico ou participatório, que pode ser causado por técnicas de contenção, anestésicos ou cirurgias (STOTT, 1981; MUIR, 1990).

A imobilização é uma das técnicas usadas para induzir estresse em ratos e foi utilizada por BAKOVA (1988), BHARIHOKE *et al.* (2000), ALMEIDA *et al.* (2000), RAÍ *et al.* (2003), BELTRAME *et al.* (2006). Os autores observaram redução no peso corporal dos animais estressados por imobilização e alterações nas funções reprodutivas. Estudos em fêmeas têm evidenciado que as alterações hormonais devido ao estresse crônico causam problemas reprodutivos, tais como anestro, ciclo estral irregular, cistos ovarianos, puberdade tardia, mortalidade embrionária e baixa taxa de ovulação (SCHOELTEN & LIPTRAP, 1978; BARD *et al.*, 1982; HENNESSY & WILLIAMSON, 1983; LOPEZ-CALDERON *et al.*, 1990; VARLEY, 1991; TSUMA *et al.*, 1998).

As respostas ao estresse classicamente conhecidas incluem a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que provoca a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a subsequente liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (GUYTON, 2002). O eixo reprodutivo é inibido em todos os níveis por vários componentes do eixo HPA. Os hormônios liberados em resposta ao estresse alteram as funções reprodutivas através do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG), inibindo a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, conseqüentemente, interferindo na liberação do hormônio folículo-

estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) e alterando o efeito estimulatório da gonadotrofina na secreção de esteróides sexuais.

O estresse é um problema social freqüente no mundo moderno e se torna mais grave quando ocorre durante a gravidez. É comum ouvirmos que o estado emocional da mãe, durante a gestação, influi no futuro bem estar emocional da criança que vai nascer ou, outras vezes, determinar até a interrupção da gravidez. DAL BELLO *et al.* (2005) aplicaram, em ratas grávidas, estresse utilizando uma caixa de Skinner onde as ratas recebiam choques de intensidade de 0,5 mA e duração de 3 segundos, do 13º ao 20º dia de gestação. O estresse, sob estas condições, levou a uma redução de ingestão de alimento e maior dificuldade em conseguir sucesso na gestação e no parto.

Estudo retrospectivo em seres humanos (WEINSTOCK, 2001) sugere que estresse crônico, durante gravidez, está associado com os níveis elevados de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), de hormônio adeno-corticotrófico (ACTH) e de cortisol. Esses hormônios podem aumentar a probabilidade do nascimento de prematuros, de atrasos no desenvolvimento, infertilidade e anomalia de comportamento nas crianças.

Muitas evidências associam a ansiedade materna ao nascimento prematuro e também ao baixo peso ao nascimento. Alterações nos níveis hormonais também podem causar alterações no desenvolvimento embrio-fetal (KHERA, 1987).

DIEGO *et al.* (2006) observaram que quanto maior o nível de problemas relacionados à depressão e ansiedade, apresentados pela mulher, menor era o tamanho de seus fetos. Os autores observaram, ainda, que os níveis elevados de cortisol estavam diretamente ligados a níveis mais altos de estresse e também a uma menor estimativa do peso fetal.

Neste trabalho, avaliou-se, de forma experimental, o desempenho reprodutivo de ratas Wistar, submetidas a estresse por contenção do 1º ao 20º dia de prenhez.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se ratas Wistar, nulíparas, sexualmente maduras, com peso variando entre 170 e 230g. Os

animais, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas, UEL, foram mantidos durante os períodos de aclimação (sete dias) e experimental, no laboratório do Departamento de Histologia em uma sala com temperatura ambiente controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 11 a 13 horas. As ratas foram alojadas, individualmente, durante a prenhez, em gaiolas de polipropileno com tampas metálicas. Água e ração foram oferecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

As ratas (n=20) foram colocadas na presença de machos (2:1) sempre no final da tarde. Na manhã seguinte, foi coletado material vaginal de cada fêmea. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e pelo diagnóstico de que a fêmea se encontrava no estro. O dia em que os espermatozoides foram encontrados no lavado vaginal foi considerado dia zero (dia 0) de prenhez (DAMASCENO et al., 2008). As ratas com suposta prenhez constituíram os grupos Controle (GC) e Experimental (GExp), cada um constituído por 10 animais.

As ratas do grupo experimental (GExp) foram imobilizadas diariamente, do 1º ao 20º dia de prenhez, das 10:00 às 11:00 horas. A contenção foi realizada dentro de um contensor (tubo de PVC) com 5cm de diâmetro e 24 cm de comprimento, colocado sobre a bancada (fig.1).

As ratas do grupo controle (GC) foram mantidas em suas gaiolas durante todo o período experimental, em ambiente adequado, sem quaisquer interferências no manejo.

No 21º dia de prenhez as ratas foram eutanasiadas, pela manhã, por dose letal de uma solução contendo Cloridrato de Cetamina, 10% (Ketamina) na proporção



Figura 1. Rata prenhe sob contenção no tubo de PVC.

de 80mg/Kg p.c. e Cloridrato de Xilasina (Anasedan) na dose de 10mg/Kg p.c. As ratas foram pesadas, calculou-se o ganho de peso materno total (Peso final – Peso inicial) e, em seguida, submetidas à laparotomia. O útero gravídico foi pesado com seus conteúdos. Foram obtidos registros do número de fetos vivos e mortos, peso fetal individual e de suas respectivas placentas, número de sítios de implantação (SALEWSKI,1964), reabsorções e de corpos lúteos.

Foram calculadas as taxas de perdas pré-implantação (Número de corpos lúteos - nº de implantação / Número de corpos lúteos X100) e de pós-implantação (Número de implantações – nº de fetos vivos/nº de implantação X 100) (DAMASCENO et al., 2008).

O índice placentário (peso da placenta/peso feto X 100) e o potencial de fertilidade (Número de implantações/ nº de corpos lúteos X100) também foram calculados.

Os recém-nascidos foram separados de suas placentas, pesados e classificados como pequeno (PIP), adequado (AIP) ou grande (GIP) para idade de prenhez, em relação à média mais ou menos 1,7 desvio padrão do grupo controle (RUDGE et al., 1998).

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL.

Análise estatística

Para análise estatística de variáveis paramétricas com distribuição normal, como ganho de peso materno, peso do útero gravídico, peso fetal, peso da placenta, número de fetos vivos, número de corpos lúteos, número de implantações e número de reabsorções foi utilizado o teste t de Student para comparação entre dois grupos. Para análise de variáveis não paramétricas, como perdas pré e pós implantação e índice placentário foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos. O nível de significância estatística foi considerado quando $p \leq 0,01$.

RESULTADOS

O ganho percentual de peso das ratas submetidas ao estresse por contenção durante a gestação foi avaliado no 21º dia de prenhez. Os resultados mostraram que embora as fêmeas do grupo

experimental tenham tido menor ganho de peso que as do grupo controle, esta diferença não foi significativa (tab.1).

O estresse por contenção reduziu, significativamente, tanto o número de implantações como o número de fetos vivos e aumentou, significativamente, o número de reabsorções nas ratas do grupo experimental em relação ao grupo controle (tab.1). O número de corpos lúteos, apesar de não significativo, também estava reduzido nas fêmeas estressadas. A média dos pesos fetais das ratas do grupo estressado no 21º dia de prenhez foi estatisticamente menor que a média dos pesos dos fetos das ratas do grupo controle. O mesmo se observou no peso das respectivas placentas (tab.2). A proporção do peso de cada placenta em relação ao feto (índice placentário) foi maior nas fêmeas estressadas em relação às do grupo controle. (tab.2). Apesar da redução no potencial de fertilidade e aumento nas perdas pré e pós implantação nas ratas do grupo experimental em relação às do grupo controle, estas diferenças não foram significativas (tab.1).

A análise da classificação do peso dos recém-nascidos mostrou que todos os fetos (100%) foram pequenos para a idade de prenhez (PIP) no grupo experimental (fig.2).

Tabela 1. Variáveis analisadas na avaliação da ação do estresse por contenção sobre o desempenho reprodutivo de ratas prenhes. Os valores são expressos por Média \pm DP (* $p < 0,01$ e # $p < 0,0001$).

Variáveis Analisadas	GC	GExp
	(n=10)	(n=10)
Ganho de peso materno (g)	86,60 \pm 5,79	78,70 \pm 4,42
Útero gravídico (g)	61,25 \pm 1,74	40,53 \pm 1,75#
Nº. Fetos vivos	11,90 \pm 0,57	9,70 \pm 0,37*
Nº. Corpos lúteos	13,50 \pm 0,45	11,60 \pm 0,80
Nº. Implantações	12,70 \pm 0,30	10,50 \pm 0,56*
Nº. Reabsorções	0,10 \pm 0,32	0,80 \pm 0,82*
Potencial de Fertilidade (%)	94,68 \pm 2,65	91,86 \pm 3,59
Perda Pré-implantação (%)	5,31 \pm 3,66	8,13 \pm 3,59
Perda Pós-implantação (%)	3,85 \pm 2,36	6,78 \pm 6,47

Tabela 2. Peso dos fetos e respectivas placentas, dos grupos controle e experimental. Os valores são expressos por Média \pm DP (* $p < 0,01$ e # $p < 0,0001$).

	GC	GExp
Peso fetal (g)	3,58 \pm 0,15	2,70 \pm 0,55#
Peso placenta (g)	0,52 \pm 0,02	0,43 \pm 0,02*
Índice Placentário (%)	14,58 \pm 0,68	20,06 \pm 1,26#

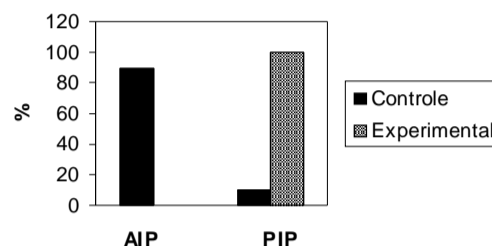


Figura 2. Classificação dos RN: Adequado para idade gestacional (AIP) = peso entre 3,34 a 3,83g e pequeno para idade gestacional (PIP) = peso abaixo de 3,33g, inclusive.

DISCUSSÃO

Analisar as repercussões de um estímulo estressor sobre a gestação é importante para a compreensão da fisiopatologia de doenças correlacionadas ao estresse que acontecem no binômio materno-fetal. Avaliar os efeitos decorrentes do estresse pode evitar o desencadeamento de processos que levam aos distúrbios materno e neonatal.

A imobilização consiste num forte estímulo estressante para os animais. Este modelo foi utilizado por vários autores em diferentes estudos (BAIKOVA, 1988 ; ALMEIDA et al., 2000; RAÍ et al., 2003 e BELTRAME et al., 2006). Redução no peso dos animais foi um dos efeitos constatados pelos autores após estímulo estressor. Da mesma forma observamos uma redução, embora não significativa, no ganho de peso das ratas estressadas.

A ação dos hormônios liberados em resposta ao estresse no eixo hipotálamo-pituitária-gonadal pode interferir na secreção de esteróides sexuais e atuar adversamente nas funções reprodutoras de roedores submetidos ao estresse. O desempenho reprodutivo das ratas estressadas foi significativamente diferente das fêmeas controles. Por exemplo, o índice de implantação e o número de fetos vivos foi significativamente menor e o número de reabsorções foi maior nas fêmeas estressadas em relação às fêmeas controles. As perdas pré e pós-implantação também foram maiores nas fêmeas estressadas, embora esse aumento não tenha sido significativo em relação às do grupo controle. Estes dados e, de acordo com outros estudos com animais (LOPEZ-

CALDERON et al., 1990; Tsuma et al., 1998), nos permitem sugerir que o estresse por imobilização é capaz de influenciar direta ou indiretamente o estado morfofuncional das gônadas causando alterações hormonais, como por exemplo, inibição dos hormônios gonadotróficos que levam a uma baixa eficiência reprodutiva. Além disso, sabe-se que os hormônios gonadotróficos são essenciais tanto para a decidualização normal do útero como para a adesão do blastocisto, o que justificaria as alterações observadas no desempenho reprodutivo das fêmeas submetidas ao estresse por contenção.

A redução de progesterona após ooforectomia com suplementação parcial do hormônio foi a razão encontrada por MARK et al. (2006) para a redução do peso fetal e placentário. O estresse aqui aplicado, por imobilização, também repercutiu negativamente sobre o peso médio dos fetos e suas respectivas placentas. Esses fetos nasceram das fêmeas submetidas diariamente ao estresse por contenção e que, coincidentemente, apresentaram redução no número de corpos lúteos. O aumento no índice placentário das fêmeas estressadas demonstrou que não houve manutenção da proporcionalidade dos fetos e das placentas no grupo estressado quando comparado ao controle.

Ao classificarmos os recém-nascidos de acordo com os seus pesos corpóreos constatamos que todos os recém-nascidos das mães estressadas foram pequenos para a idade gestacional. O crescimento fetal está intimamente ligado à ocorrência satisfatória da nutrição fetal e às trocas materno-fetais que ocorrem na placenta. A privação crônica de nutrientes para o feto em desenvolvimento é a principal razão para o crescimento intra-uterino retardado. A manutenção normal de todo o processo de crescimento fetal desde a invasão trofoblástica, o fluxo de sangue na placenta e a barreira placentária é fundamental e influencia diretamente o peso fetal (PAGEL et al., 1990). Os resultados obtidos neste trabalho, como alterações reprodutivas e baixo peso fetal-placentário são decorrentes da submissão das ratas prenhes a um efeito adverso, a imobilização e podem ser decorrentes de alterações tanto no equilíbrio neuro- endócrino materno assim como

nos mecanismos das trocas materno-fetais.

Os possíveis efeitos nocivos causados pelo estresse se instalarão quanto mais cedo ocorrer a estimulação aversiva, mas ainda é uma incógnita se tais efeitos repercutirão no desenvolvimento de doenças futuras.

Diante do exposto, acreditamos que este estudo no qual submetemos ratas prenhes a estímulo estressante crônico, representado aqui pela imobilização, pode contribuir com estudos do estresse como causador de restrição no crescimento uterino e, ainda subsidiar estudos futuros sobre como esta alteração pode influenciar no desenvolvimento posterior destes fetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.A.; KEMPINAS, W.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. 2000. Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33 (9): 1105-1109.
- BAKOVA, O.V. 1988. Cyto-Physiologic indicators of the status of the reproductive organs of male rats after 7-days of immobilization stress and 7-days of hypokinesia. **Kosmicheskaia Biologiia I Aviakosmicheskaia Meditsina** 22 (5): 55-59.
- BARD, C.R.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B.; FONDA, E.S.; KISER, T.E. 1982. Inhibition of ovulation and LH secretion in the gilt after treatment with ACTH or hycortisone. **Journal of Reproduction and Fertility** 62: 85-92.
- BEAUDOIN, A.R. 1980. Embryology and Teratology In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. **The laboratory rat**. San Diego, Academic Press. 240p.
- BHARIHOKE, V.; GUPTA, M. & GOHIL, H. 2000. Bronchopulmonary changes after repeated exposure to cold & restraint stress. **Journal of the Anatomy Society India** 49(1): 49-51.
- BELTRAME, F.L.; MESQUITA, S.F.P.; CAMARGO, I.C.C. 2006. Análise histomorfológica e estereológica do testículo em ratos pré-púberes submetidos ao estresse induzido por imobilização. **Revista Brasileira de Zootecias** 8 (2): 139-146.
- DAL-BELLO, A.C.; RIUL, T.R.; de OLIVEIRA, L.M. 2005. Desnutrição e estresse na gestação: medidas comportamentais das mães e dos filhotes durante a lactação. **Temas em Psicologia** 13 (1): 34-44.
- DAMASCENO, D.C.; KEMPINAS, W. De G.; VOLPATO, G. T.; CONSONNI, M.; RUDGE, M. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. 2008 **Anomalias congênitas: estudos experimentais**. Belo Horizonte, COOPMED, 102p.

- DIEGO, M.; JONES, N.A.; FIELD, T.; HERNANDEZ-REIF, M.; SCHANBERG, S.; KUHN, C.; GONZALEZ-GARCIA, A. 2006. Maternal psychological distress, prenatal cortisol and fetal weight. **Psychosomatic Medicine** **68**: 747-753.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. 2002. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 973p.
- HENNESSY, D.P.; WILLIAMS, P. 1983. The effect of stress and ACTH administration in hormone profiles, oestrus and ovulation. **The riogenology** **20**:13-26.
- KHERA, K.S. 1987. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorder a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. **Critical Reviews in Toxicology** **17**: 345-375.
- LOPEZ-CALDERON, A.; GONZALEZ-QUIJANO, M.I.; TRESQUERRES, J.A.F. & ARIZNAVARETTA, C. 1990. Role of LHRH in the gonadotropin response to restraint stress in intact male rats. **Journal of Endocrinology** **124**: 241-256.
- MARK, P.J.; SMITH, J.T., WADDELL B.J. 2006. Placental and fetal growth retardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. **Placenta** **27**: 208-214.
- MUIR, W.W. 1990. The equine stress response to anesthesia. **Equine Veterinary Journal** **22** (5): 302-303.
- NAEYE, R.L.; BLANC, W.; PAUL, C. 1973. Effects of maternal nutrition of the human fetus. **Pediatrics** **52**: 494-503.
- PAGEL, M.D.; SMILKSTEIN, G.; REGEN, H.; MONTANO, D. 1990. Psychosocial influences on newborn outcome: a controlled prospective study. **Social Science & Medicine** **30**: 597-604.
- RAI, J.; PANDEY, S.N. & SRIVASTAVA, R.K. 2003. Effect of immobilization stress on spermatogenesis of albino rats. **Journal of the Anatomy Society India** **52**(1): 55-57.
- RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; MAESTÁ, I.; RAMOS, M. D. ; PERAÇOLI, J.C.; CURI, P. 1998. Insulinoterapia na prenhez de ratas diabéticas: Repercussões fetais e placentárias. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** **20** (1): 19-24.
- SALEWSKI, E. 1964. Färbemethode zum makroskopischen nachweis von implantations-stellen am uterus der ratte. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**: 247-367.
- SHOELTEN, J.A.; LIPTRAP, R.M. 1978. Arole for the adrenal cortex in the onset of cystic ovarian follicles in the sow. **Canadian Journal of Comparative Medicine** **42** : 525-533.
- STOTT, G.H. 1981. What is animal stress and how is it measured? **Journal of Animal Science** **52**: (1): 150-153
- TSUMA, V.T.; EINARSSON, S.; MADEI, A.; FOSBERG, M. & LUNDEHEIM, N. 1998. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. **ACTA Veterinaria Scandinavica** **39**: 71-76.
- VARLEY, M. 1991. Stress and reproduction. **Pig News and Information** **12**: 567-571.
- WAGNER, A.E.; MUIR, W.W.; HINCHCLIFF, K.W. 1991. Cardiovascular effects of xilazine and detomidine in horses. **American Journal of Veterinary** **52**(5):652-657.
- WEINSTOCK, M. 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. **Progress in Neurobiology** **65**: 427-451.

Recebido: 24/07/2008
 Revisado: 24/09/2008
 Aceito: 02/03/2010