

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENEFONTE

**EFEITOS OSTEOPÊNICOS E DOPPLERFLUXOMETRIA FETAL EM
RATAS *WISTAR* PRENHES EXPOSTAS À ENOXAPARINA E À
HEPARINA NÃO FRACIONADA EM DOSES PROFILÁTICA E
TERAPÊUTICA**

CAMPO GRANDE
2017

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENEFONTE

**EFEITOS OSTEOPÊNICOS E DOPPLERFLUXOMETRIA FETAL EM
RATAS *WISTAR* PRENHES EXPOSTAS À ENOXAPARINA E À
HEPARINA NÃO FRACIONADA EM DOSES PROFILÁTICA E
TERAPÊUTICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Antonio Figueiró-
Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

CAMPO GRANDE
2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENEFONTE

**EFEITOS OSTEOPÊNICOS E DOPPLERFLUXOMETRIA FETAL EM
RATAS WISTAR PRENHES EXPOSTAS À ENOXAPARINA E À
HEPARINA NÃO FRACIONADA EM DOSES PROFILÁTICA E
TERAPÊUTICA**

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

Campo Grande (MS), 27 de Junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos (Presidente)

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

Prof. Dr. Carlos Henrique Marques dos Santos (Membro)

Instituição: UFMS

Prof. Dr. José Lacerda Brasileiro (Membro)

Instituição: UFMS.

Prof. Dra. Lucylea Pompeu Muller Braga (Membro)

Instituição: Universidade para o desenvolvimento da região do Pantanal (UNIDERP).

Prof. Dr. Thiago Franchi Nunes (Membro)

Instituição: UFMS.

Prof. Dr. André Luís Alonso Domingos (Suplente)

Instituição: UFMS e UNIDERP.

DEDICATÓRIA

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

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

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

Aos meus filhos, **Ana Flavia Senefonte** e **Lucas Senefonte**, que me proporcionaram a alegria inestimável de ser pai. Cada sorriso e abraço são verdadeiras injeções de ânimo e dão força revigorante para encarar os desafios da vida.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos**, outro mestre por excelência, um dos fundadores deste programa de mestrado e doutorado e grande incentivador da qualificação de muitos profissionais deste e de outros Estados. Também tive a honra de contar com seus ensinamentos na faculdade de medicina e na residência médica de cirurgia geral. Se não fosse por ele desenvolver este programa em Campo Grande talvez não tivesse feito em outro lugar. Obrigado professor pela oportunidade e por contribuir para nossa formação.

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

Aos funcionários do Biotério e do laboratório de técnica cirúrgica e cirurgia experimental, **todos**, que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

Ao laboratório LAC que por intermédio do Dr. **Alexandre Nakao Odashiro** foram efetuados o método histológico e a preparação da laminas deste trabalho com zelo e dedicação além da sua documentação, digitalização e análise.

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

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

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

RESUMO

Senefonte, F.R.A. Efeitos osteopênicos e Dopplerfluxometria fetal em ratas *Wistar* prenhes expostas à enoxaparina e à heparina não fracionada em doses profilática e terapêutica. Campo Grande; 2017. [Tese - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivou-se avaliar os efeitos da exposição de ratas *Wistar* prenhes, pesando entre 160g e 250g, à enoxaparina e heparina não fracionada (HNF), em doses profilática e terapêutica sobre a dopplerfluxometria fetal e sobre a matriz óssea do fêmur destas ratas. As drogas empregadas no experimento foram a enoxaparina e a HNF, nas doses profiláticas respectivamente de 1mg/Kg/dia e 72UI/Kg/dia administradas via subcutânea (SC) e nas doses terapêuticas, também respectivamente, de 2mg/Kg/dia e 400UI/Kg/dia. As ratas foram distribuídas em cinco grupos (I a V), nos quais foram randomizadas em grupos controle (I), enoxaparina dose profilática (II), enoxaparina dose terapêutica (III), HNF dose profilática (IV) e HNF dose terapêutica (V). Considerou-se o dia zero da prenhez de todos os animais como o início da experimentação. Realizou-se ultrassonografia sob anestesia intraperitoneal no 18º dia de prenhez onde se avaliou a velocidade de pico sistólico (VPS), índice de Pulsatilidade (IP), índice de resistência (IR) e formato de onda espectral do fluxo sanguíneo de amostra da artéria cerebral média, do ducto venoso e da artéria umbilical de três fetos por corno uterino, sendo o primeiro e último de cada corno e o terceiro aleatório entre estes, com total de seis fetos por animal. Por último, procedeu-se à análise da dopplerfluxometria das artérias uterinas. No 20º dia de prenhez, cada animal foi submetido à eutanásia por meio de uma dose letal anestésica, seguido por laparotomia para histerectomia e ooforectomia bilateral em bloco. Uma vez aberto o útero, contaram-se os fetos, seguido da retirada destes fetos para anotação do sexo, pesagem dos fetos e respectivas placentas. Após a laparotomia, realizou-se incisão medial em coxa direita ou esquerda, aleatoriamente, desde ligamento inguinal até o joelho para dissecação e retirada do fêmur, sendo este medido seu comprimento e peso e posteriormente análise histológica. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística através dos testes “t” de Student e ANOVA para variáveis paramétricas e dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis para variáveis não-paramétricas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05. Conclusões: Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando se relacionou peso médio dos fetos, peso médio das placentas, medianas dos índices dopplerfluxométricos nas artérias cerebral média, ducto venoso, artérias umbilicais e artérias uterinas, comprimento médio dos fêmures, peso médio dos fêmures e áreas trabeculares ósseas médias.

Palavras-chave: heparina, enoxaparina, dopplerfluxometria fetal, ducto venoso, osteopenia.

ABSTRACT

SENEFONTE, F.R.A. Osteopenic effects and Doppler fetal flow in *Wistar* rats exposed to enoxaparin and unfractionated heparin in prophylactic and therapeutic doses. Campo Grande, 2017. [Thesis, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil].

The objective of this study was to evaluate the effects of exposure of pregnant *Wistar* rats, weighing between 160g and 250g, to enoxaparin and unfractionated heparin (UFH) at prophylactic and therapeutic doses on fetal doppler fluxometry and on the bone matrix of the femurs of these rats. The drugs used in the experiment were enoxaparin and UFH, at the prophylactic doses respectively of 1mg / kg / day and 72UI / kg / day administered subcutaneously (SC) and at therapeutic doses respectively of 2mg / kg / day and 400UI / Kg / day. The rats were divided into five groups (I to V), in which they were randomized in control (I), enoxaparin prophylactic dose (II), enoxaparin therapeutic dose (III), UFH prophylactic dose (IV) and UFH therapeutic dose (V). The zero day of pregnancy of all animals was considered as the beginning of the experiment. Ultrasonography was performed under intraperitoneal anesthesia on the 18th day of pregnancy, in which the systolic peak velocity (SPV), Pulsatility Index (PI), resistance index (RI), and spectral waveform of sample blood flow of the cerebral artery, venous duct and umbilical artery of three fetuses per uterine horn, the first and last of each horn being the third random among them, with a total of six fetuses per animal. Finally, we performed the analysis of the doppler fluxometry of the uterine arteries. On the 20th day of pregnancy, each animal was submitted to euthanasia by means of a lethal anesthetic dose, followed by laparotomy for hysterectomy and bilateral block oophorectomy. Once the uterus was opened, the fetuses were counted, followed by the withdrawal of these fetuses for sex annotation, fetal weighing and placentas. After laparotomy, a right or left medial incision was made at the right knee from the inguinal ligament to the knee for dissection and removal of the femur, which measured its length and weight and then histological analysis. The data were submitted to statistical analysis using Student's t-tests and ANOVA for parametric variables and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for non-parametric variables. Statistically significant differences were considered when the "p" value was lower than 0.05. Conclusions: There were no statistically significant differences between the groups when the mean fetal weight, average placental weight, median Doppler flowmetry indexes were found in the middle cerebral arteries, venous duct, umbilical arteries and uterine arteries, mean femur length, mean femur weight, and mean bone trabecular area

Key words: heparin, enoxaparin, fetal Doppler flowmetry, venous duct, osteopenia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias do ganho de peso diário após 7 dias de prenhez.....	77
Tabela 2- Médias do ganho de peso diário após 14 dias de prenhez.....	78
Tabela 3- Médias do ganho de peso diário após 20 dias de prenhez.....	78
Tabela 4- Médias do ganho de peso diário nos diferentes períodos de prenhez.....	79
Tabela 5- Médias do peso dos fetos após 20 dias de prenhez.....	80
Tabela 6- Médias do peso das placentas após 20 dias de prenhez.....	80
Tabela 7- Médias do número de fetos/animal após 20 dias de prenhez.....	81
Tabela 8- Frequência de animais que apresentaram eventos hemorrágicos após 20 dias de prenhez.....	82
Tabela 9- Número de fetos/ animal e fetos/corno uterino após 20 dias de gestação....	83
Tabela 10- Ganho de peso materno diário na ultima semana de prenhez, peso fetal e peso placentário após 20 dias de gestação.....	84
Tabela 11- Comparação dos índices de dopplerfluxometria fetal das ratas <i>Wistar</i> expostas à enoxaparina e heparina não fracionada, conforme cada vaso estudado.....	85
Tabela 12- Comparação dos índices de dopplerfluxometria das artérias uterinas das ratas <i>Wistar</i> expostas à enoxaparina e heparina não fracionada.....	86
Tabela 13- Peso femoral seco após extração, desidratação e remoção de gordura....	86
Tabela 14- Peso femoral após descongelamento e reidratação.....	87
Tabela 15- Comparação do peso femoral médio antes e após congelamento.	88
Tabela 16- Comprimento femoral médio das ratas nos grupos controle e experimentais.....	89
Tabela 17- Comparação entre os grupos quanto ao percentual médio de área do osso trabecular por campo.....	90
Tabela 18 -Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais em ratas prenhes expostas à enoxaparina e HNF em doses profilática e terapêutica.....	90

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1- Estrutura da heparina antes de ser esterificada pelo ácido sulfúrico	24
Quadro 1- Classificação dos anticoagulantes segundo o FDA.....	29
Figura 2- Influência do ângulo de insonação.....	40
Figura 3- Volumes de amostra, ângulo de insonação e equação Doppler.....	40
Figura 4- Exemplo de imagem tríplice com modo Doppler colorido e pulsado (ou espectral).....	41
Figura 5- Fórmula do volume de fluxo.....	42
Figura 6- Exemplo de onda espectral e análise de dopplervelocimetria.....	44
Figura 7- Exemplo de padrões de onda espectral obtidos pelo emprego do Doppler nos vasos fetais adaptado de Kiserud <i>et al</i> (2004).....	46
Quadro 2- Grupos e drogas testadas	61
Figura 8 - (a) Desenho do estudo: amostras fetais nos cornos uterinos. Neste modelo, escolhemos o primeiro e último feto e um em porção intermediária em cada corno uterino. (b) Exemplo de Doppler pulsado da artéria uterina e (c) do ducto venoso (note volume de amostra próximo ao coração, em topografia hepática). (d) Desenho esquemático da anatomia de identificação dos principais vasos sanguíneos abordados no estudo.....	65
Figura 9– Cornos uterinos com a presença dos fetos e placentas com 20 dias de prenhez.....	67
Figura 10 – Cornos uterinos retirados “em bloco” com a presença de fetos e respectivas placentas com 20 dias de prenhez.....	68
Figura 11 – Cornos uterinos abertos evidenciando os fetos, placentas, sítios de implantação e corpos lúteos após 20 dias de prenhez.....	69
Figura 12 - Incisão longitudinal em coxa do ligamento inguinal até joelho. (Nota-se que para fins de ilustração, optou-se neste animal em iniciar pela extração do fêmur antes da laparotomia).....	71
Figura 13 - Divulsão muscular até identificação e dissecação do fêmur.....	72
Figura 14 - Extração completa do fêmur.....	73
Figura 15- A) Imagem de área trabecular para análise no programa. B) Imagem da área trabecular com projeção da gráticula para contagem dos pontos de intersecção. C) Área total recortada da imagem de área trabecular obtida pela ferramenta histograma.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM	Artéria cerebral média
ANOVA	Análise de Variância.
AT	Anti-trombina.
AU	Artéria(s) umbelical(is).
BAX	BCL-2 Associated to protein X.
BCL-2	B-Cell Lymphoma protein.
CASPASE	<u>cysteine-aspartic-acid-proteases</u>
DP	Desvio padrão.
DV	Ducto venoso.
FDA	Food and Drug Administration.
IP	Intraperitoneal (quando referir anestesia). Índice de pulsatilidade (quando referir ultrassonografia/ dopplerfluxometria).
IM	Intramuscular.
IR	Índice de resistência.
IV	Intravenoso.
HELLP	HE - Anemia hemolítica, do inglês: Hemolytic anemia; EL - Enzimas hepáticas elevadas, do inglês: Elevated Liver enzymes; LP - Baixa contagem de plaquetas, do inglês: Low Platelet count.
HBPM	Heparina de Baixo Peso Molecular.
HNF	Heparina não fracionada.
n.s	Não significativo.
PCa	Proteína C ativada.
PE	Pré-eclâmpsia.
PRF	Pico de repetição de fluxo
PS	Proteína S.
PVS	Pico de velocidade sistólica
RCIU	Restrição de crescimento intra-uterino.
RNI	Razão normatizada internacional.
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípide.
SC	Subcutâneo.

SF	Solução fisiológica. Soro fisiológico.
TEV	Tromboembolismo venoso.
TEP	Tromboembolia pulmonar.
TVP	Trombose venosa profunda.
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UNIDERP	Universidade para o Desenvolvimento do Estado e Região do Pantanal
VDF	Velocidade diastólica final
VM	Velocidade média
VPS	Velocidade de pico sistólico

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dia.
dl	Decilitro.
dpi	<i>Dots per inch</i> (Pontos por polegada)
g	Gramas.
h	Hora.
Hz	Hertz.
Kg	Quilograma.
<	Menor que.
m	Metro
mg	Miligramas.
ml	Mililitro.
mm	Milímetro.
mm ³	Milímetro cúbico.
%	por cento.
s	segundo
UI	Unidades internacionais.
X	Vezes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Anticoagulantes heparina e enoxaparina: moléculas e história.....	23
2.2 Anticoagulação no período gestacional.....	25
2.3 Efeitos das heparinas sobre modulação trofoblástica e seus efeitos anti- apoptóticos.....	30
2.4 Estudos experimentais sobre efeitos das heparinas sobre metabolismo ósseo, processos inflamatórios e cicatrizacionais em ratos.....	32
2.5 Ultrassom, ultrassonografia no período gestacional e dopplerfluxometria fetal.....	34
2.6 Estudos experimentais sobre dopplerfluxometria fetal.....	49
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4 MATERIAL, ANIMAIS E MÉTODOS.....	58
5 RESULTADOS.....	77
6 DISCUSSÃO.....	91
7 CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	115
ANEXO A- Carta de aprovação do comitê de ética.....	115
ANEXO B- Tabela de ajuste de dose do grupo V.....	116
ANEXO C – Exemplos de lâminas de trabécula óssea do fêmur.....	117
ANEXO D – Carta de aceite de publicação ACTA CIRURGICA.....	118
ANEXO E- Artigo ACTA CIRURGICA <i>In press</i>	119
ANEXO F- Mini-biografia do autor.....	134

1 INTRODUÇÃO

Com o emprego frequente de anticoagulantes em gestantes e o conhecimento sobre seus efeitos no desenvolvimento da interligação uteroplacentária assim como no metabolismo ósseo, aliados ao fato do uso rotineiro da ultrassonografia na triagem sistemática do desenvolvimento fetal, levantaram-se dúvidas sobre a influência destas drogas anticoagulantes na dinâmica do fluxo sanguíneo útero-placentário-fetal e como causadora de osteopenia em modelo experimental (PELLICER, 2011; ERDEN, 2006; WISE, 1980).

Os eventos tromboembólicos são a principal causa de mortalidade materna. A anticoagulação na gestação, especialmente em doses profiláticas em pacientes com história de abortos ou perdas fetais prévias, trombofilia conhecida ou antecedente de tromboembolismo venoso aumentou nas últimas décadas. Entretanto, não há isenção de riscos e a maioria dos efeitos colaterais já são bem estabelecidos. Os anticoagulantes mais seguros na gestação são as heparinas (KEARON, 2016; PELLICER, 2011; MAIZ, 2009; DUCK, 2008; MILLER, 1994).

Estudos experimentais de uso das heparinas na gestação evidenciaram efeitos que melhoram modulação, invasão e adesão uteroplacentária, com menores índices de perdas fetais, abortamentos e pré-eclâmpsia (ZHANG, 2012; ERDEN, 2006).

Entre as rotinas de exames de triagem pré-natais a ultrassonografia tem papel de destaque, pois permite estudo morfológico e fisiológico, este especialmente obtido pelo emprego da técnica do ecoDoppler, cuja avaliação da Doppler-velocimetria ou

Doppler-fluxometria da circulação fetal torna-se importante ferramenta de rastreamento e pesquisa de probabilidades para anomalias genéticas como as aneuploidias, preditores de pré-eclampsia, crescimento intrauterino restrito e sofrimento fetal (MAIZ, 2009).

Em função do elevado uso do ultrassom no primeiro trimestre gestacional houve aumento do número de estudos averiguando a segurança e os bioefeitos da exposição dos fetos ao Doppler (PELLICER, 2011; DUCK, 2008; MILLER, 1994). A avaliação de doppler-fluxometria dos índices de resistência e pulsatilidade e morfologia de onda espectral das artérias uterinas, artérias umbilicais, ducto venoso e artéria cerebral média prediz boa formação placentária e oxigenação fetal (CHEEMA, 2012, KALACHE, 2012; MAIZ, 2009).

As heparinas possuem um efeito na reabsorção óssea e este efeito foi descoberto em função de relatos na literatura de gestantes que apresentaram fraturas espontâneas de vértebras lombares após uso prolongado destas drogas anticoagulantes no período gestacional (WISE, 1980). Apesar deste achado, outros fatores de risco foram relacionados como idade materna e osteopenia fisiológica da gestação, como campo aberto para pesquisa.

Justificou-se a presente tese em virtude das lacunas de conhecimento encontradas diante de um tema importante em saúde materno-fetal pela grande utilização das drogas anticoagulantes heparina não fracionada e a enoxaparina, uma heparina de baixo peso molecular, tanto em doses profiláticas quanto terapêuticas e seus efeitos deletérios sobre a massa óssea materna, além de aproveitar um recurso diagnóstico relativamente simples, também de emprego em larga escala para triagem de alterações

no desenvolvimento fetal cujos resultados desta triagem podem ser afetados pelo uso de medicamentos como os referidos anticoagulantes objetos deste estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

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

A principal droga anticoagulante é a varfarina, que por atravessar a barreira placentária e ter efeito positivo sobre teratogênese fetal, encontra-se contra-indicada na gestação, salvo algumas poucas indicações (BATES, 2012). Alternativamente, neste período, pode-se e é mais utilizada a heparina não fracionada (HNF), que não atravessa a barreira placentária (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; KEARON, 2016). Entretanto, esta droga exige monitoração constante da anticoagulação com ajustes de dose e sabidamente pode provocar osteopenia materna com seu emprego por períodos prolongados, como na gravidez (VASCONCELOS, 2006). Em uso cada vez mais frequente devido, em comparação com a HNF, apresentar menor risco de sangramento e osteopenia, não ter necessidade de monitorização do efeito anticoagulante e conseqüentemente, sem necessidade de ajustes de dose, a enoxaparina tem seu emprego crescente na prática médica (SARDINHA; SILVESTRE, 2006) e em especial no período gestacional, contudo, sem estudos clínicos e experimentais amplos com demonstração de sua segurança. Um modelo experimental para avaliar efeitos de drogas em animais prenhes sobre taxas de fertilidade e prognóstico perinatal de suas crias pode responder alguns questionamentos.

A morte fetal *in utero*, a restrição de crescimento fetal intrauterino, a pré-eclâmpsia grave e de início precoce são causas importantes de morbimortalidade perinatal (BATES, 2012). No exame histológico dos vasos uteroplacentários e da arquitetura da

invasão trofoblástica dessas gestações são típicos o aumento da deposição de fibrina, a trombose e as alterações endoteliais e do trofoblasto associados à hipóxia. Estes achados sugerem que a trombose da circulação uteroplacentária estaria implicada na fisiopatologia destes quadros obstétricos (SILVEIRA, 2002).

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

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

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

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

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

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

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

(UCHIKOVA; LEDJEV, 2005). Uma das explicações para este aumento seria o maior volume plasmático durante o terceiro trimestre (HELLGREN, 2003; KEMKES-MATTHES, 2001). Também no terceiro trimestre ocorrem mudanças hormonais, como aumento dos níveis de estrogênio, com modulação das variáveis dos fatores de coagulação. Ocorrência similar é observada em mulheres que usam anticoncepcionais orais (UCHIKOVA; LEDJEV, 2005).

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

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

O tratamento é realizado com anticoagulantes (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; KEARON, 2016). Estes medicamentos podem ser de vários tipos e os principais usados no tratamento do tromboembolismo são os anticoagulantes orais derivados dos cumarínicos, sendo a varfarina a mais conhecida, e as heparinas, que são anticoagulantes de uso predominantemente parenteral.

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

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

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

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

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

Os protocolos de tratamento anticoagulante neste período sugerem que o uso da varfarina seja interrompido logo dada a confirmação da gestação, sendo contraindicado entre a 6^a e 12^a semanas, podendo ser reutilizadas entre a 13^a semana até meados do

terceiro trimestre da gestação (34^a semana). Nestes períodos sem o cumarínico, utilizam-se as heparinas (BATES, 2012; SILVEIRA, 2002; GINSBERG, 1999; ROBIN, 1999).

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

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

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

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

- Risco de sangramento na junção útero-placentária, abortamento, descolamento de placenta, prematuridade e óbito fetal.
- As heparinas não são secretadas no leite materno e tem seu uso permitido no puerpério (BATES, 2012; DIMITRAKAKIS, 2000; HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b).

- As heparinas não atravessam a barreira placentária (VASCONCELOS, 2006; DIMITRAKAKIS, 2000; HIRSH, 1991a; HIRSH, 1991b)
- As HBPM parecem estar associadas a menor risco de sangramento, de osteoporose e de trombocitopenia induzida por heparina do que as HNF (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; SANSON, 1999).
- Raros casos de necrose de pele podem acontecer (SARDINHA; SILVESTRE, 2006; THOMAS; VILLAS, 2006).

2.1 Anticoagulantes heparina e enoxaparina: moléculas e história.

Os anticoagulantes são fármacos que evitam a formação do coágulo ao interferir nas vias da coagulação. A heparina foi descoberta por um estudante de medicina chamado McLean em 1916 quando pesquisava a natureza de pró-coagulantes, porém, sua denominação ocorreu anos mais tarde quando Howel descobriu que este mucossacarídeo era abundante no fígado, daí o nome heparina. Da observação da ação anticoagulante *in vitro* passou-se ao seu uso *in vivo* no tratamento da trombose venosa. A ação anticoagulante por intermédio da ligação da heparina com um co-fator, a antitrombina plasmática foi descoberta em 1939 (MAJERUS, 2003; PEREIRA, 2002).

A heparina é constituída por uma mistura de moléculas altamente eletronegativas de ácidos mucopolissacarídicos sulfatados. Sua base molecular é um glicosaminoglicano, que pode ser encontrado nos grânulos secretores dos mastócitos, sendo abundante nos pulmões, fígado e intestino dos mamíferos (PEREIRA, 2002).

A heparina é normalmente obtida da mucosa intestinal suína e do pulmão bovino. Seus preparados comerciais possuem peso molecular que variam de 5.000 a 40.000 daltons e são formados por polímeros de dissacarídeos dos ácidos D-glicosamina-L-glicurônico e D-glicosamina-D-glicurônico como pode ser observada na figura 1 (PEREIRA, 2002). Deste mesmo precursor dissacarídico podem ser sintetizados os glicosaminoglicanos sulfatos de heparan e sulfatos de dermatan presentes nas superfícies endoteliais e matriz extracelular com ação antitrombótica natural.

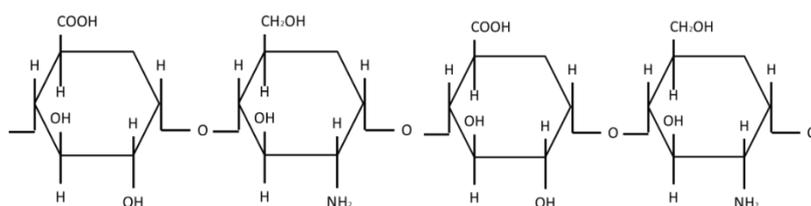


Figura 1. Estrutura da heparina antes de ser esterificada pelo ácido sulfúrico (PEREIRA, 2002).

A heparina após sofrer esterificação apresentará um resíduo 3-O-sulfatado, que será o local de ligação com a antitrombina, um polipetídeo de 58.000 daltons de peso molecular, que ligado à heparina inibe rapidamente a trombina inibindo os fatores de coagulação ativados da via intrínseca e comum. A absorção da heparina é deficiente pela mucosa intestinal, deste modo é utilizada por via parenteral, sendo a via intravenosa a mais indicada e sua dose pode variar devido a alguns fatores plasmáticos e assim é monitorada com o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), cujos parâmetros se

fazem antes do início da terapia e durante, preferencialmente dosados cerca de uma hora antes da administração (MAJERUS, 2003).

A heparina pode ter seu efeito revertido por forte inibição em contato com uma mistura de polipeptídeos básicos isolados do esperma de salmão, que é o sulfato de protamina (MAJERUS, 2003).

As heparinas de baixo peso molecular possuem em média entre 1.000 e 10.000 dáltons, ligam-se a antitrombina, porém, por seu menor tamanho não catalisam a inibição trombina-antitrombina, mas catalisam a inibição antitrombina-fator Xa (MAJERUS, 2003). Sua principal vantagem em relação à heparina padrão, agora denominada de heparina não fracionada consiste no seu perfil farmacocinético mais estável e previsível, o que permite administração por via subcutânea em doses ajustadas ao peso corporal sem monitoramento laboratorial rotineiro, menor incidência de trombocitopenia induzida pelas heparinas, menor frequência de eventos hemorrágicos e osteopenia, além de permitir um tratamento ambulatorial (MAJERUS, 2003).

2.2 Anticoagulação no período gestacional

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

fetais, o que sugeriu que os fármacos anticoagulantes possam ter benefícios terapêuticos nas mulheres com complicações vasculares gestacionais.

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

Com objetivo de substituir de vez o emprego da HNF no período gestacional, cada vez mais está sendo usada a HBPM, como a enoxaparina. Ela também não atravessa a barreira placentária, por ser composta por moléculas grandes, não causando hemorragia fetal ou teratogenicidade (DIMITRAKAKIS, 2000), além de possuir melhor biodisponibilidade, (ROBIN, 1999). Discute-se também que pode ser menos provável que induza a plaquetopenia e a osteoporose (SHEFRAS, 1996; WARKENTIN, 1995). Vantagens adicionais se relacionam pela maior praticidade de uso e a dispensa de monitorização frequente dos níveis de anticoagulação (SARDINHA; SILVESTRE, 2006).

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

estimulada por paratormônio, que se observou em um modelo experimental com ratos expostos às heparinas (PIERCY, 1997).

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

O uso de HBPM nas grávidas com trombofilias deve ser iniciado logo após confirmação ecográfica da viabilidade embrionária ou fetal. Embora se saiba que as HBPM não necessitem de monitorização constante, na gravidez ocorrem alterações fisiológicas (cardiovasculares, hemostáticas e renais), além de uma produção da heparinase placentária que altera a farmacocinética das HBPM, motivo pelo qual alguns autores sugerem considerar o seu monitoramento através da dosagem da atividade do fator Xa (BRENNER, 2005).

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

O estudo conduzido por Brenner *et al.* (2000) mostrou que o tratamento com HBPM iniciada no primeiro trimestre de gestação em pacientes com histórico de abortamentos de repetição e morte fetal intrauterina portadoras de diagnóstico de trombofilias, resultou em aumento significativo do número de filhos vivos. O número de

crianças nascidas vivas sem a utilização da HBPM esteve em torno de 20%, enquanto os nascidos vivos após o uso das HBPM ficaram em torno de 75%. O mecanismo para explicar este efeito ainda é desconhecido, mas parece estar envolvido com o fenômeno de trombose placentária, modulação da invasão trofoblástica e apoptose dos tecidos placentários e deciduais (ZHANG, 2012; ERDEN, 2006).

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

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

Quadro 1- Classificação dos anticoagulantes segundo o FDA.

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

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

Categoria A: Estudos controlados não demonstram riscos;

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

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

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

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

NA: Não avaliado.

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

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

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

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

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

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

não interferiram na expressão de laminina. Este achado pode justificar a menor taxa de perdas fetais ou abortamentos, mas, não elucidou todo este mecanismo protetor (ERDEN, 2006).

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

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

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

Estudo realizado por Zhang *et al.* (2012) observou efeito antiapoptótico placentário com o uso das HBPM em modelo experimental de ratas com pré-eclâmpsia. Neste trabalho 30 ratas *Wistar* foram distribuídas aleatoriamente em três grupos. Um grupo recebeu apenas SF em volume semelhante ao da enoxaparina, outro grupo teve indução de pré-eclâmpsia (PE) experimental com a introdução de L-name e foi utilizado também SF e o terceiro grupo, recebeu L-name para induzir a PE e enoxaparina. Foi avaliada pressão arterial, proteinúria, número de filhotes, peso de fetos e placentas

enquanto o índice de apoptose foi medido com ensaio TUNEL de Western-blotting para BCL-2 e BAX. O índice de apoptose foi significativamente maior no grupo PE com SF e houve uma supressão significativa da expressão de BAX no grupo tratado com enoxaparina.

Atualmente, parece ser o mecanismo antiapoptótico das heparinas que norteará as próximas pesquisas tanto experimentais quanto clínicas com seu emprego. Outra publicação revelou um efeito protetor das heparinas sobre o processo neuroinflamatório decorrente de mecanismo apoptótico em tecidos cerebrais expostos a sangue, como nos casos de hemorragia subaracnóide (SINARD, 2012). Baseado em um modelo experimental de hemorragia subaracnoide em ratos expostos a dose subanticoagulante de heparina não fracionada (10U/Kg/h) encontraram-se resultados animadores em relação a um menor processo neuroinflamatório do que no grupo controle, exposto a solução fisiológica (SINARD, 2012).

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

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

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

Os efeitos osteopênicos das heparinas, tanto a HNF quanto a HBPM são bem conhecidos. Entretanto, pouco se sabe sobre sua reversibilidade e o tempo que pode levar

para que ocorra. Neste sentido Shaughnessy *et al.* (1999) pesquisaram por meio de uma avaliação histomorfométrica de fêmur de ratos se a perda óssea induzida pela heparina seria revertida depois da descontinuação do tratamento em ratos por um período semelhante ao tempo de uso. Neste estudo foram utilizados HNF em doses de 1UI/g subcutâneo (SC) 12/12h ou HNF 0,5UI/g SC 12/12h ou SF na mesma proporção de volume, também através da via SC 2x/dia, durante 28 dias. Metade dos animais de cada grupo após este período inicial teve análise histomorfométrica e a outra metade foi mantida por mais 28 dias sem administração das drogas/ SF para realizar a eutanásia para análise da placa de crescimento epifisário proximal do fêmur direito. A perda óssea observada logo após o tratamento foi maior no grupo que recebeu HNF 1UI/g, com perda média de 30% de massa óssea. Não se observou melhora dos parâmetros de perda óssea nos grupos tratados com HNF após 28 dias da suspensão da medicação, o que sugeriu a baixa reversibilidade dos efeitos ou a necessidade de períodos maiores de observação.

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

2.5 Conceitos de ultrassom, ultrassonografia no período gestacional e dopplerfluxometria fetal.

O ultrassom é um método de diagnóstico por imagem com vantagens de ser não invasivo, reprodutível, de baixo custo, auxiliar procedimentos ecoguiados e permitir avaliar anatomia e fisiologia, conhecido também como estudo dinâmico. A detecção de fluxo sanguíneo pelo recurso ecoDoppler aprimorou sua utilização ao demonstrar com facilidade a fisiologia circulatória. Sua desvantagem principal é ser operador dependente e equipamento dependente e também apresenta limitações para estudo de ossos e pulmões. O seu uso pode ser aplicado em praticamente todo o corpo (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Entre as principais vantagens do ultrassom destacam-se:

1. É um método não-invasivo ou minimamente invasivo;
2. As imagens seccionais podem ser obtidas em qualquer orientação espacial;
3. Não apresenta efeitos nocivos significativos dentro do uso diagnóstico na medicina;
4. Não utiliza radiação ionizante;
5. Possibilita o estudo não-invasivo da hemodinâmica corporal através do efeito Doppler;
6. A aquisição de imagens é realizada praticamente em tempo real, permitindo o estudo do movimento de estruturas corporais (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Por definição, ultrassom é a vibração que se propaga num meio elástico com uma frequência superior a 20.000Hz e que é inaudível pelo sistema auditivo humano, mas audível à animais como cachorros, morcegos e golfinhos (PELLERITO, 2012).

Em 1794, Lazzaro Spallanzini descreve o fenômeno do sonar dos morcegos, como sistema de ecolocalização e caça de suas presas, primeiro conceito das ondas sonoras em varredura ambiental. Em 1880, Jacques e Pierre Curie descobrem os cristais piezoelétricos onde uma energia mecânica poderia ser convertida em energia acústica e vice-versa, sendo a base para a construção dos primeiros transdutores (PELLERITO, 2012). Entre 1940 e 1950 os sonares começam a se aperfeiçoar e entrar em prática inicialmente na indústria militar e depois gradativamente na metalurgia e medicina. Na área médica o primeiro sistema de ultrassom data de 1948 com geração de imagem em preto e branco. Os transdutores passam a ser desenvolvidos ao mesmo tempo que os computadores e em 1971 surgem as imagens com níveis de intensidade de ecos representadas por diferentes tons de cinza na tela. Com o aprimoramento de *softwares* entre 1980 e 1990 surge o Doppler vascular, partindo do princípio físico do efeito Doppler para captar movimento e traduzir direção de fluxo. Já entre 1990 e 2000 inicia-se a era da reconstrução em três dimensões e atualmente estamos na era da miniaturização da tecnologia e conexão sem fio (PELLERITO, 2012).

A formação da imagem decorre dos cristais piezoelétricos no transdutor. Resulta da aplicação de uma pressão mecânica sobre a superfície de certos cristais que são capazes de gerar um potencial elétrico entre superfícies opostas, produzindo som numa frequência superior a 20KHz, conhecido como ultrassom (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

A aplicação do ultrassom nos cristais resultava na conversão de energia mecânica em eletricidade e quando um pulso de ultrassom é direcionado a uma substância, uma

parte deste som é refletida de volta a sua fonte com informações sobre o tipo de estrutura que penetrou (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

O transdutor é constituído por uma unidade básica e sua conexão ao computador dá-se por intermédio de cabos e mais recentemente vem se incorporando a tecnologia sem fio (SALLES-CUNHA, 2016). A unidade básica converte uma forma de energia em outra.

Os transdutores são montados de maneira a produzir e receber os ecos gerados pelas diversas interfaces. Existem diversos tipos de transdutores, sendo cada um adequado para um tipo de exame.

Compõe um transdutor:

- Materiais piezoelétricos (cristais/ cerâmicas).
- Aparato eletrônico (eletrodos para a excitação dos cristais e captação dos ecos).
- Lente acústica.
- Material que acopla a lente aos cristais.
- Material de amortecimento posterior (que absorve as frequências indesejáveis produzidas eventualmente) (PELLERITO, 2012).

Os elementos piezoelétricos (cristais ou cerâmicas) que compõem os transdutores têm a capacidade de emitirem eletricidade quando pressionados e ao mesmo transformam energia elétrica em mecânica (onda sonora), que é chamado efeito piezoelétrico inverso. São, portanto transmissores e receptores simultaneamente (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

O transdutor emitirá um pulso curto que na medida em que atravessa os tecidos, será parcialmente refletido pelas interfaces de volta ao transdutor. Em geral 1% da energia

sonora incidente é refletida e o restante continua sua trajetória através dos tecidos (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

O equipamento guarda o tempo gasto entre a emissão do pulso e a recepção do eco, transformando-o em distância percorrida, na representação do eco na tela, já estando calibrado para uma velocidade fixa de 1540m/s. Assim, quanto maior o tempo gasto para receber o eco de uma interface, mais longe da superfície da imagem ele a coloca. Desta forma, quanto mais longe está a estrutura da superfície do transdutor, ela aparecerá em situação mais inferior na tela (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Após a emissão de pulsos de ultrassom, eles interagem com os tecidos e os ecos refletidos ou dispersos são transformados em energia elétrica pelo transdutor e processados eletronicamente pelo equipamento para formação da imagem. Esta forma de processar os ecos refletidos (em imagem bidimensional) é denominada modo-B (brilho) (PELLERITO, 2012).

Além desta forma de processamento dos ecos, existem outras como os gráficos de amplitude (modo-A, muito utilizado em oftalmologia) e gráficos de movimentação temporal (modo-M, bastante empregado em ecocardiografia) (PELLERITO, 2012).

Além disso, podemos ter efeitos físicos que influenciam na formação da imagem. O comprimento de onda e a frequência influem na resolução da imagem, a amplitude está relacionada com a energia empregada e essa tem que ser controlada para que não gere muita interferência na imagem. O mesmo com a velocidade que deve estar controlada em 1540 m/s (velocidade média do som no corpo humano, exceto nos locais com ar). Mas o mais importante dos fatores na formação da imagem é a impedância acústica, pois está relacionada com a densidade e resistência dos materiais do corpo (PELLERITO, 2012).

Entre tecidos moles e ar há a necessidade do gel de acoplamento entre a pele e o transdutor para evitar que o feixe de som fosse refletido por causa da interface

transdutor/ar, dificultando visualização (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

A variação de absorção, refração e reflexão do som é que provoca a variação das cores na tela (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007) e daí deriva a terminologia em imagem. Assim temos:

- **Anecóico/Anecogênico/Transssônico:** Ausência de ecos, transmissão completa de som - (negro).
- **Ecóico/Ecogênico:** Presença de ecos - (escala de cinza).
- **Hipercóico/Hiperecogênico:** Ecos brilhantes, estruturas altamente reflexivas - (branco).
- **Hipoecóico/Hipoecogênico:** Ecos esparsos, reflexão ou transmissão intermediária - (cinza).
- **Isoecóico/Isoecogênico** - estruturas com a mesma eco-textura ou ecogenicidade.

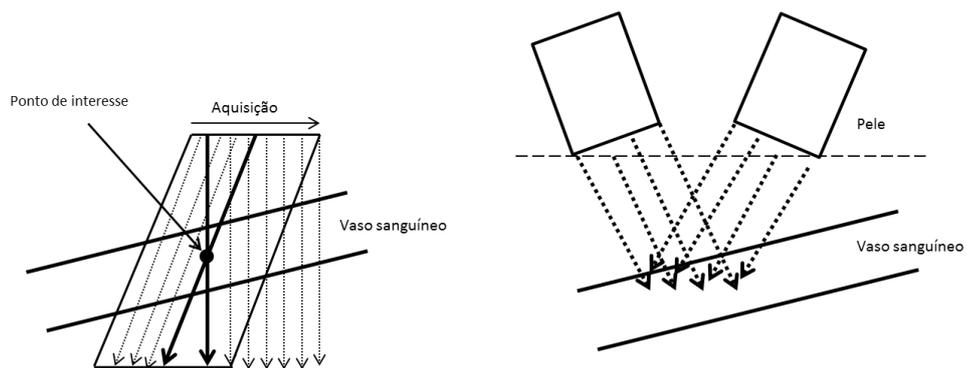
O efeito Doppler em ultrassonografia é uma característica observada nas ondas quando emitidas ou refletidas por um objeto que está em movimento com relação ao observador (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007), sendo uma homenagem a Johann Christian Andreas Doppler, que o descreveu teoricamente pela primeira vez em 1842 (SALLES-CUNHA, 2007).

O modo Doppler é dividido em colorido, de amplitude e espectral. O colorido consiste em posicionar uma caixa de cor, que nada mais é do que uma amostra de feixes ultrassonográficos para focar nos ecos de movimento na região delimitada por esta caixa, que vai então captar o movimento do fluxo sanguíneo, sua velocidade e direção. Quando as velocidades são mais baixas e necessita-se maior precisão do fluxo utiliza-se o modo

Doppler de amplitude, onde a mesma caixa de cor vai ser “traduzida” num padrão de cor diferente específico para detalhar contornos e regiões de baixo fluxo sanguíneo (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

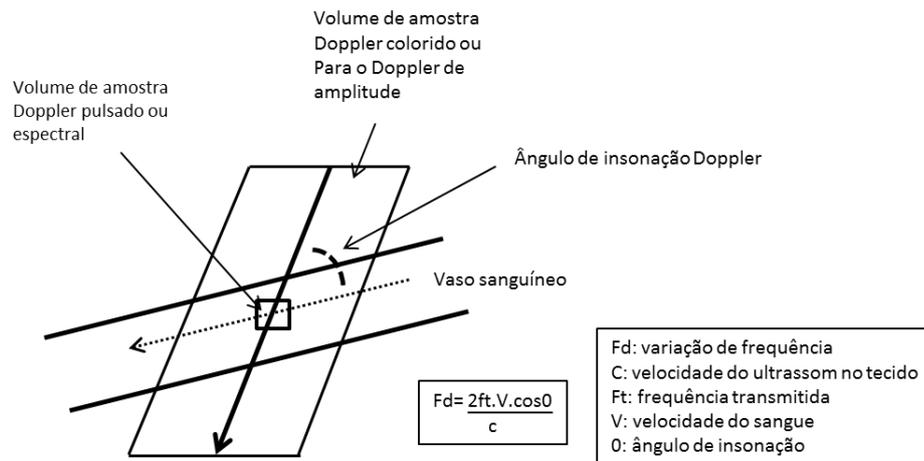
O ponto de maior interesse na observação de um fluxo sanguíneo pode ser avaliado com um novo volume de amostra para se obter a análise espectral, que nada mais é do que a tradução do fluxo sanguíneo em um gráfico de onda. Quanto menores as caixas/volumes de amostra, menos interferência e mais qualidade de informações pode se obter. Outro aspecto relevante se deve em relação ao ângulo de insonação do feixe ultrassonográfico em relação à linha principal de fluxo de um vaso sanguíneo (figura 2). A curva de velocidade obtida pela aferição dependerá de uma equação (figura 3) onde o ângulo formado entre o feixe emissor de ultrassom e o sentido principal do fluxo sanguíneo será o principal determinante da inferência da velocidade real neste vaso sanguíneo, pois baseia-se no cosseno deste ângulo. Sendo assim, insonações perpendiculares (90°) terão velocidade “zero” e insonações com ângulos de 60° terão velocidade de metade do real e o ângulo de 0° , muito difícil de se obter, seria a velocidade multiplicada por um (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007). Por esta razão dá-se preferência para insonações de 60° .

Figura 2. Influência do ângulo de insonação



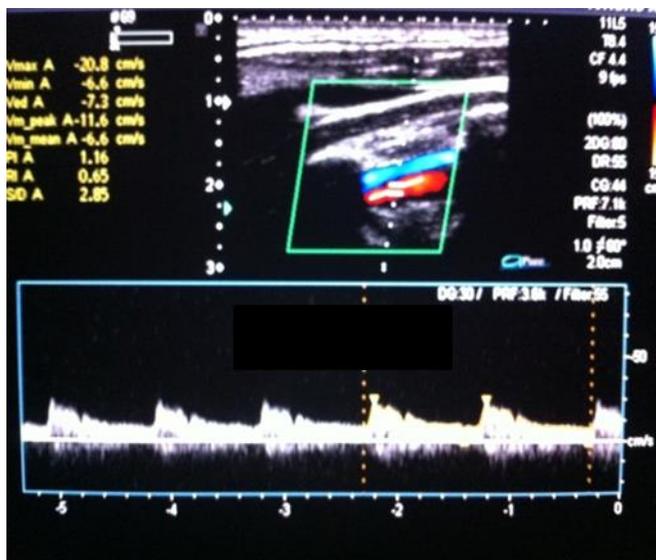
Fonte: Adaptado de SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007.

Figura 3. Volumes de amostra, ângulo de insonação e equação Doppler



Fonte: Adaptado de SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007.

Figura 4. Exemplo de imagem tríplex com modo Doppler colorido e pulsado (ou espectral).



Fonte: Acervo pessoal.

No modo Doppler pulsado ou espectral, ao posicionar o volume de amostra no centro do vaso será obtido uma amostra de velocidades de fluxo e seu comportamento quanto velocidade máxima, mínima e resistência, que serão traduzidos no computador com a construção de um gráfico de velocidades conhecido como onda espectral. Para um gráfico com pouca interferência prefere-se pequenos volumes de amostra, os menores possíveis e com angulação de insonação de 60° ou 0° (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007). Com as informações desta curva de velocidades calculamos a velocidade de pico sistólico, o índice de pulsatilidade e o índice de resistência (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Deve-se ter em mente de que a hemodinâmica pode estar fora do habitual com hipertensão arterial, anemia, policitemia. Por isso, nas anemias, ocorrem fluxos com velocidades mais elevadas (menor viscosidade), enquanto que na policitemia ocorre o inverso (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

O fluxo sanguíneo é calculado pela seguinte fórmula:

Figura 5. Fórmula do volume de fluxo.

$$\text{Volume de fluxo} = \frac{\Delta \text{ pressão} \cdot \text{diâmetro}^4}{128 \cdot \text{comprimento} \cdot \text{viscosidade}}$$

Fonte: Adaptado de SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007.

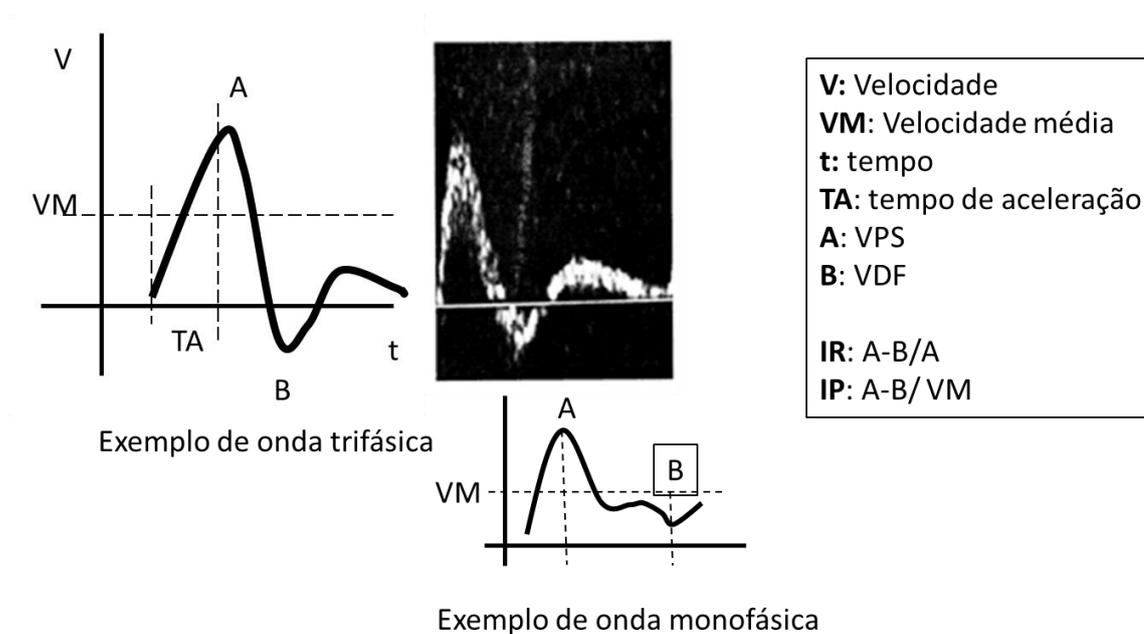
A detecção do fluxo sanguíneo sofrerá influência da escala de frequência que ficar o filtro do aparelho de ultrassom no início do exame. Caso se escolha uma escala alta, ou seja, mais alta do que a média de velocidades de fluxo encontradas naquela região anatômica em que se pesquisa, haverá dificuldades em se encontrar determinados vasos sanguíneos e, não os encontrando, a menos que estejam ocluídos, dever-se-á reduzir esta escala até que se detecte algum fluxo. Por outro lado, se a escolha da escala, ou como está em alguns aparelhos os picos de repetição de fluxo (PRF), estiver baixa, poderá ocorrer um grande extravasamento de cor para fora dos contornos de onde se localiza o vaso sanguíneo, fenômeno conhecido como “*bleeding*” de cor ou se formará um mosaico intenso de cores em determinado ponto, que representa um fluxo cujas médias de velocidade estão superiores ao nível pré-ajustado, o que é conhecido como “*aliasing*”. Para seu ajuste, deverá aumentar a escala ou PRF do aparelho até que se diminua este mosaico de cor (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Após correta identificação do vaso sanguíneo a ser estudado, procede-se os ajustes de escala das velocidades e posicionamento de um volume de amostra para análise espectral no centro do vaso. Com ângulo de insonação adequado obtém-se a formação da onda

espectral que representa a amostra de média de velocidades daquele fluxo sanguíneo. Esta onda terá um componente sistólico (primeira onda de ejeção pós contração miocárdica transmitida a todo sistema circulatório fechado) caracterizado por um segmento ascendente até formar um pico máximo, onde passa a decrescer correspondendo ao período de relaxamento miocárdico, ou diastólico, até iniciar nova fase sistólica. Esta onda decrescente poderá ou não ultrapassar uma linha de base, que quando ocorre representa uma onda de resistência periférica aumentada, e quando a linha atinge um vale máximo inicia-se a sua subida de aceleração sistólica. Conforme o tempo de aceleração e desaceleração pode-se influir sobre a hemodinâmica e isto irá repercutir no formato de onda. Alguns vasos sanguíneos terão fluxo característicos onde a onda na desaceleração não ultrapassará a linha de base quando reinicia sua curva ascendente de aceleração, representando baixa resistência periférica e a depender do segmento estudado pode representar normalidade tecidual ou metabólica ou não. Sendo assim analisa-se o formato da onda em monofásico, bifásico ou trifásico, se ela atravessa a linha de base na sua desaceleração (bifásico e trifásico), se ela é curta ou alargada conforme o tempo que demora seu ciclo completo de propagação e terá um pico de velocidade máxima, denominado pico de velocidade sistólica (PVS), vale de deflexão máxima ou um ponto do início ascendente denominado velocidade diastólica final (VDF). Para analisar esta curva de velocidades, pode ser de modo automatizado com um recurso de programa previamente existente do aparelho de ultrassom, onde a depender da qualidade do traçado obtido já realiza todos os cálculos desta onda espectral, ou se houver muita interferência ela poderá ser calculada manualmente com posicionamento de cursores nos pontos referidos e então o programa calcula os índices de velocimetria a partir dos pontos selecionados pelo examinador (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Os índices de dopplervelocimetria (figura 6) de análise de uma onda espectral serão a velocidade média (VM), o índice de Pulsatilidade (IP) e o índice de resistência (IR) e são os parâmetros de velocidade utilizados para se analisar os padrões de fluxo naquele vaso sanguíneo de determinado segmento corporal e poderá traduzir conformidade ou não com sua hemodinâmica habitual e estar alterado em situações metabólicas gerais ou patológicas, por alteração da frequência cardíaca, viscosidade sanguínea, resistência periférica tecidual entre outros (SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007).

Figura 6. Exemplo de onda espectral e análise de dopplervelocimetria



Fonte: Adaptado de SALLES-CUNHA, 2016; SALLES-CUNHA, 2007.

Apesar de ser um exame considerado inócuo o ultrassom quando aplicado por muito tempo pode produzir alguns efeitos teciduais, pela vibração e frequência de

emissão dos feixes acústicos pode ocorrer aquecimento tecidual e os principais efeitos biológicos observados que serão tempo de exposição dependentes são listados abaixo (PELLERITO, 2012).

Efeitos biológicos:

- Aumento no metabolismo.
- Vasodilatação.
- Redução dos espasmos musculares (Aquecimento das terminações tendíneas de Golgi).
- Diminuição da viscosidade dos líquidos.
- Correntes acústicas (pode aumentar a permeabilidade nas células)
- Ondas estacionárias; aumento das taxas de difusão de íons através das membranas celulares.

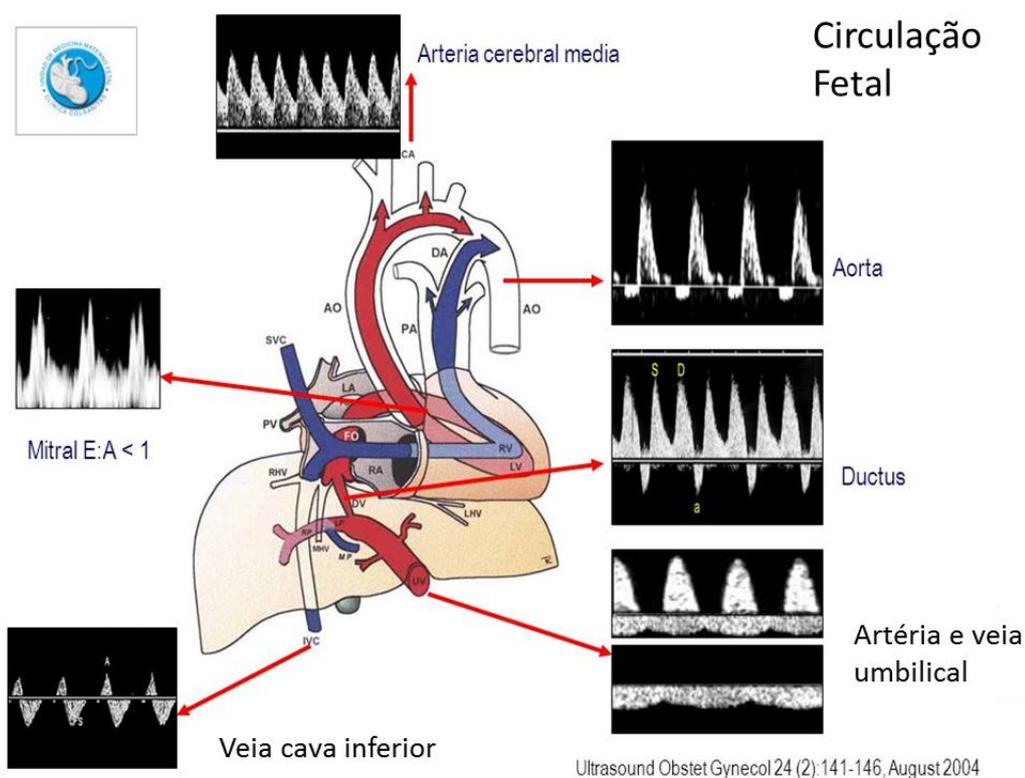
Tais efeitos são motivos de alguns estudos experimentais que serão citados mais adiante.

Baseados nestes princípios ultrassonográficos e de dopplerfluxometria entende-se o seu emprego no monitoramento de diversas situações em medicina e entre elas na medicina fetal tornou-se importante ferramenta na triagem e diagnóstico de adequado desenvolvimento fetal (MAIZ, 2009; KALACHE, 2009). Entende-se também que alterações da hemodinâmica, fisiológicas ou até provocadas por medicamentos podem até ser interpretadas como situações patológicas ou de fato, levará a alterações patológicas com conseqüente modificação do padrão de dopplerfluxometria.

Em medicina fetal, os vasos mais estudados refletem o comportamento das principais estruturas chave na vigilância do desenvolvimento fetal. As artérias cerebrais

médias para inferência do desenvolvimento cerebral, o ducto venoso para vigiar tecidos cardíacos e hepáticos num modo geral, as artérias umbilicais para entender a dinâmica da circulação feto-placentária e as artérias uterinas maternas para avaliar a dinâmica uteroplacentária (KALACHE, 2009). Os formatos da onda espectral são resumidos na figura 7 adaptada de Kiserud *et al.* (2004).

Figura 7. Exemplo de padrões de onda espectral obtidos pelo emprego do Doppler nos vasos fetais.



Fonte: adaptado de Kiserud *et al.* (2004).

Os vasos mais estudados no exame ultrassonográfico fetal são a artéria cerebral média, o ducto venoso, artéria umbilical e as artérias uterinas (KALACHE, 2012). A hemodinâmica fora do usual pode inferir alterações no desenvolvimento fetal e saúde de uma boa implantação placentária (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012; MAIZ, 2009).

A velocimetria na artéria cerebral média fetal pode produzir evidências da presença ou ausência de anemia e em casos de restrição do crescimento intrauterino (RCIU) o risco de lesões hipóxicas. As formas de onda de ducto venoso são um indicador muito bom de inferir o risco fetal e devem ser usadas quando as formas de onda da artéria umbilical tornam-se anormais. O Doppler da artéria uterina no início da gestação pode refletir o estado da vasculatura placentária, sendo uma excelente ferramenta para prever o risco de pré-eclâmpsia ou RCIU (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012).

Uma pesquisa de fluxo sanguíneo ao Doppler em 147 gestações únicas com risco para parto pré-termo objetivou avaliar o papel do ultrassom Doppler no início do segundo trimestre para mensurar a predição do risco para crescimento intrauterino restrito e índice de enrolamento umbilical e área de corte do cordão umbilical para realizar os testes. Concluiu-se nesse estudo que o índice de enrolamento umbilical medido no segundo trimestre é útil na previsão do nascimento de um bebê pequeno para a idade gestacional e pode servir como um marcador para restrição de crescimento subsequente (DEGANI, 2001).

A avaliação dopplerfluxométrica das artérias cerebrais médias (ACM) indiretamente mede o grau de oxigenação do cérebro fetal. Num feto bem oxigenado o IR e IP da ACM são altos pois não há necessidade de fluxo cerebral alto para manter a oxigenação (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012).

A importância desta vigilância ultrassonográfica também pode ser exemplificada por uma pesquisa sobre padrões do fluxo sanguíneo nas artérias uterinas, umbilicais e cerebrais médias, veia umbilical e ducto venoso em gestantes de alto risco, que foi realizada com mensuração das medidas ultrassonográficas destes vasos até 72h antes do parto com 88 gestantes onde se procurou correlacionar com os desfechos adversos (CHEEMA, 2012). Dos resultados observou-se forte correlação entre presença de

pulsações venosas umbilicais e baixa pontuação de Apgar em cinco minutos, gasometria anormal e necessidade de assistência ventilatória, assim como foi correlacionada também maior prematuridade e admissão na unidade de terapia intensiva de recém nascidos que tinham alterações nos seus parâmetros dopplerfluxometricos da artéria umbilical, sendo que por sua vez os casos de alterações na veia umbilical na amostra não tiveram correlação com desfecho perinatal adverso (CHEEMA, 2012).

O segundo vaso a ser estudado é o ducto venoso (DV), onde se mede indiretamente o gradiente de pressão venosa central. O ducto é um ramo da artéria umbilical que leva sangue oxigenado sob pressão para o átrio esquerdo passando pelo átrio direito e forame oval. A morfologia da onda do ducto venoso possui as ondas S (sístole ventricular), D (diástole ventricular) e A (sístole atrial) e são todas positivas. Numa situação de hipóxia importante com aumento da pré carga cardíaca o DV apresenta aumento de seu índice de pulsatilidade venoso. Caso a hipóxia seja grave com comprometimento miocárdico, a onda A tende a desaparecer ou ser reversa (o sangue retorna ao DV) (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012; ROYSTON, 1998).

Por sua vez, logo abaixo do ducto venoso segue-se o estudo das artérias umbilicais, que indiretamente refletem um alerta sobre mau funcionamento placentário especialmente quando ocorre aumento do IR ou IP (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012; ROYSTON, 1998).

Por fim, após avaliação destes três principais vasos a análise do fluxo das artérias uterinas permitirá saber um pouco sobre a saúde da implantação placentária (KALACHE, 2012). Quando tem-se um fluxo de artérias uterinas considerado normal é porque a passagem do sangue que vai das artérias uterinas, passando pelas arqueadas, seguindo pelas radiais e as espiraladas, está fácil. Esta condição é decorrente de uma boa implantação placentária com uma boa invasão do trofoblasto. Sendo assim, quando o IR

ou IP estão elevados para a idade gestacional, poderá indicar aumento de risco para CIUR (crescimento intrauterino restrito) e para pré-eclâmpsia em decorrência de um mau implante placentário. Habitualmente em humanos este exame é realizado em torno de 20 semanas, mas há quem considere a partir de 26 semanas gestacionais, pois neste momento já deve ter completado a migração trofoblástica (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012).

2.6 Estudos experimentais sobre dopplerfluxometria fetal.

Estudos de ultrassonografia fetal em ratas prenhes é um campo aberto e promissor no estudo experimental perinatal que ajudará a reduzir os sacrifícios destes animais para a pesquisa do desenvolvimento fetal (STASINOPOULOU, 2014; HERNANDEZ-ANDRADE, 2014). No geral, sua importância reside no fato de que o emprego do ultrassom é rotineiro na prática obstétrica (CHEEMA, 2012; MAIZ, 2009; DUCK, 2008).

Algumas drogas podem ter efeito sobre esta hemodinâmica e criar falsos positivos ou mesmo provocar alterações no desenvolvimento fetal. Em pesquisa experimental isso pode significar menos sacrifício de animais (STASINOPOULOU, 2014; HERNANDEZ-ANDRADE, 2014; DUCK, 2008). Alguns padrões de observação de medidas paramétricas como a dopplerfluxometria vem ao longo dos anos permitindo a construção de escalas de normalidade que vem servindo de parâmetro quando se pesquisa influência de distúrbios na fisiologia (ROYSTON, 1998).

Outro ponto abordado se baseia na discussão sobre a segurança do ultrassom no desenvolvimento fetal (DUCK, 2008). Pesquisas já evidenciaram lesão intestinal (MILLER, 1994), hepática (PELLICER, 2011) e cerebral (LI, 2015; YANG, 2012) com

exposição prolongada de fetos de ratos ao ultrassom, relacionados a um efeito térmico (DUCK, 2008). Estudo experimental (LI, 2015) expôs ratas prenhes em três momentos de seu período gestacional, com seis, 12 e 18 dias em dois subgrupos, um com exposição a quatro minutos e outro a 20 minutos e então, após dois meses do nascimento as crias foram submetidas ao labirinto de água de Morris para avaliar memória e aprendizagem onde se obteve déficits significativos nas crias expostas a 20 minutos, corroborados com posterior análise histoquímica que também demonstrou redução de proteínas receptoras do hipocampo. Neste sentido, estudos experimentais nesta linha de pesquisa devem levar em conta um tempo de exame efetivo próximo de quatro minutos e se ultrapassar este tempo, interromper o exame para recuperação do aquecimento provocado. Porém, este intervalo de descanso ainda deve ser estudado (LI, 2015).

Outros autores apresentaram um estudo sobre a influência da exposição pré-natal ao ultrassom sobre a integridade da barreira hematoencefálica (LI, 2015) em ratos fetais. Para tanto, pesquisou-se a presença do corante azul de Evans permeado no parênquima cerebral das crias nos períodos de 10, 17, 24 e 38 dias. A presença do corante confirmava a perda de integridade da barreira hematoencefálica. O tempo de exposição ao ultrassom foi de uma hora e duas horas por nove dias consecutivos pré-natais. Utilizaram-se 139 animais e observou-se que os expostos a duas horas de ultrassom diário tiveram uma quantidade significativamente maior de extravasamento de corante detectado no 10º dia pós natal. Não houve casos que apareceram com este tempo maior de exposição ao ultrassom nos grupos com mais de 10 dias de pós-natal, o que revelou alterações precoces. Os grupos expostos ao tempo de uma hora de ultrassom apresentaram pequenas alterações de peso corporal e do cérebro. Os autores então concluíram serem necessárias investigações mais aprofundadas sobre estes efeitos da exposição de ultrassom durante o

período potencialmente vulnerável do desenvolvimento da barreira hematoencefálica humana (LI, 2015).

Sabe-se que quando há má formação cerebral ou hipóxia há grandes chances de se mudar o padrão de fluxo na artéria cerebral média, por exemplo (CHEEMA, 2012). Deste modo, seria mais uma ferramenta na pesquisa de teratogenicidade e desenvolvimento cerebral em experimentação com drogas em relação a um controle. Neste caso, ao procurar mudanças nos índices de VPS, IR e IP na avaliação da artéria cerebral média fetal, como alteração de morfologia de onda e de seus índices, quando presentes, seriam critérios diagnósticos presuntivos. Com o mesmo raciocínio pode-se empregar a mesma metodologia para estudar efeitos de drogas diversas com o desenvolvimento da placentação ou trombose placentária, sendo nestes casos estudadas as artérias uterinas (CHEEMA, 2012; KALACHE, 2012). Medicamentos que atuem negativamente na placentação podem ter seus efeitos mensurados por esta técnica. As heparinas por sua vez já tiveram estudos experimentais (ZHANG, 2012; ERDEN, 2006) que demonstraram aumentar e melhorar a invasão trofoblástica, efeito benéfico que corrobora seu emprego em gestantes trombofilicas ate mesmo profilaticamente para prevenir trombose placentária ou má placentação e consequente perda fetal ou abortamento.

Em consonância com a linha de pesquisa de exposição experimental de ratas a drogas no período gestacional e uso do estudo ultrassonográfico encontrou-se uma pesquisa sobre hérnia diafragmática congênita e sua relação com hipoplasia pulmonar (YANAMOTO, 2014). Esta condição de baixo desenvolvimento do pulmão está associada com os portadores da hérnia diafragmática congênita, pois há restrição de espaço para um ou ambos pulmões se desenvolver. Nestes casos, é proposto um

tratamento com um vasodilatador com objetivo de aumentar a massa pulmonar. Foi empregado o sildenafil nesta amostragem e o estudo comparou índices dopplerfluxométricos da artéria pulmonar fetal em seu 20º dia de prenhez assim como peso dos pulmões após o nascimento. Nesta pesquisa o uso do ultrassom foi útil em demonstrar alterações preditoras de gravidade nos índices dopplerfluxométricos como foi importante também na avaliação da resposta destes mesmos índices com a droga empregada.

Avaliações em humanos sobre efeitos da exposição de drogas no período gestacional sobre os parâmetros Doppler de circulação fetal e uteroplacentária são descritos em um estudo com 66 gestantes de gestação única que receberam betametasona durante o período pré-natal acompanhadas de medidas de dopplervelocimetria (EKIN, 2016). Aferiram-se medidas Doppler dos índices de pulsatilidade (IP) na artéria umbilical (AU), artéria cerebral média (ACM), ducto venoso e artérias uterinas maternas antes da primeira dose e 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira dose de Betametasona. As mulheres com fluxo diastólico positivo na AU e aquelas com fluxo diastólico ausente ou invertido na AU foram avaliadas separadamente. Observou-se nessa pesquisa 24 mulheres com fluxo diastólico reverso ou ausente na AU. A administração de betametasona materna foi seguida por uma diminuição significativa no IP da ACM às 24h ($p < 0,05$). Adicionalmente, o retorno do fluxo de ausente a positivo, invertido para ausente ou de reverso para fluxo diastólico positivo na AU foi detectado dentro de 24h em quase 80% dos fetos com ausência ou fluxo diastólico reverso na AU. Todas as alterações foram transitórias e mantidas até 72 h. Os autores concluíram que a exposição de betametasona no pré-natal está associada a alterações significativas, mas transitórias, no fluxo sanguíneo fetal sugerindo deste modo vigilância intensiva de fetos com ultrassonografia (EKIN, 2016).

Outra possibilidade de utilizar a ultrassonografia nos estudos experimentais em ratas seria o fato de que pesquisadores às vezes enfrentam dificuldades no diagnóstico de gravidez e avaliação do desenvolvimento embrionário. Atualmente o método mais empregado para confirmação de prenhez é o esfregaço vaginal (STASINOPOULOU, 2014). A ultrassonografia é um método de imagem não-invasiva com efeitos colaterais mínimos tanto sobre os operadores quanto para os examinados, com vantagens de fornecer avaliação em tempo real da fisiologia das estruturas que se movimentam rapidamente como o fluxo sanguíneo e batimentos cardíacos e facilita a avaliação do desenvolvimento de tecido fetal. O Ultrassom ainda distingue tecidos com base na composição, tornando-se o método de imagem de escolha para exame abdominal. Desta forma, um estudo (STASINOPOULOU, 2014) com ratas Wistar avaliou características embrionárias detectáveis pelo método ecográfico onde concluiu-se como o oitavo dia da gestação destas ratas como primeiro momento em se detectar gravidez e a partir daí elaborou-se um cronograma detalhado de características embrionárias detectadas pela ecografia entre o oitavo e 19º dia de prenhez em trabalho metuculoso para elaborar um atlas que auxilie a reduzir o sacrifício de animais durante os estudos de desenvolvimento embrionário (STASINOPOULOU, 2014).

No tocante a análise da perfusão placentária pelo método ecográfico outro estudo (ZHOU, 2013) usou mais um recurso disponível para avaliar a circulação que é o contraste ecográfico. Atualmente os contrastes são em forma de microbolhas, o que permite um realce na imagem de vasos sanguíneos sendo preenchidos por estes e conseqüentemente uma boa ferramenta para avaliar órgãos maciços, como a placenta, em tempo real. Para tanto empregou-se sessenta ratas em tempos de gestação diferentes (15 dias, 17 dias e 20 dias) submetidas a injeção de microbolhas. As alterações de realce das imagens dinâmicas na placenta foram medidas e parametrizadas com programas de

computador. Compararam-se densidades e parâmetros de aprimoramento em segmentos ou na totalidade da placenta estudada com intuito de conhecer tempo de pico do realce, porção cuja intensidade de realce se iniciava e terminava e diferenças gerais a depender da idade gestacional observada, onde os autores concluíram pela viabilidade do método do uso do contraste ecográfico alocando mais uma ferramenta nas linhas de pesquisa da área de medicina fetal experimental.

Um estudo procurou se havia modificações nos parâmetros de dopplerfluxometria materna e fetal em ratas do mesmo modo que ocorre em humanos (HERNANDEZ-ANDRADE, 2014). Para tanto, utilizou-se modelo experimental de prenhez em ratas Wistar para avaliação com ultrassom linear de alta frequência, onde se obteve os achados de mudança nos parâmetros de velocimetria e IP e IR a semelhança do que ocorre nos humanos. A medida que progrediu a gestação notou-se aumento significativo das velocidades e redução do índice de resistência compatível com o aumento progressivo de fluxo sanguíneo para o rato fetal no fim da gestação. Na presente amostra, sobre os efeitos da exposição dos anticoagulantes na velocimetria dos vasos materno-fetais houve apenas um tempo de avaliação na gestação, que foi o décimo oitavo dia de prenhez.

Sabe-se que diferentes altitudes podem influenciar no desenvolvimento fetal e também podem reproduzir velocidades diferentes na avaliação com Doppler (GALAN, 2000), conforme observado em um estudo que pesquisou e comparou a velocimetria Doppler de fetos onde as mães residiam em cidade de baixa altitude (Milão- Itália), referência para nível do mar (40m de altitude) e alta altitude (Denver, Colorado, USA), referência para altitude moderadamente alta (1609m) (GALAN, 2000). Nesse estudo, 119 gestantes foram submetidas à análise de forma de onda Doppler dos seguintes aspectos: artéria umbilical, artéria uterina, artéria cerebral média, ducto venoso e válvulas tricúspide e mitral (GALAN, 2000). Obtiveram como resultados baixo peso ao nascer e

redução das relações sistólicas e diastólicas das artérias uterina e umbilical significativos nos fetos de Denver. Concluiu-se que altitude moderadamente alta não afeta o índice Doppler vascular uteroplacentário ou fetal e pode refletir aclimatização normal nos fetos menores de Denver (GALAN, 2000).

A importância do acompanhamento e entendimento de recursos diagnósticos como os parâmetros dopplerfluxométricos permite a execução de grandes estudos que visam reconhecer índices e ou marcadores que auxiliem no diagnóstico precoce e intervenção para tentar mudar um desfecho ruim, como o estudo EVERREST (SPENCER, 2017), que é coorte prospectivo multicêntrico europeu de seis anos para definir as características clínicas e biológicas de gravidezes afetadas pelo início precoce da restrição de crescimento fetal severa, com peso fetal abaixo do percentil três. Os dados visam identificar marcadores bioquímicos e ultrassonográficos de prognóstico em gestações com peso fetal baixo entre 20 e 26 semanas de gestação além de verificar a segurança e eficácia do emprego da terapia genética nestas situações. Com os resultados que serão provenientes deste estudo objetiva-se apoiar o desenvolvimento de uma nova terapia para a RCIU severo de início precoce, descrevendo em detalhes a história natural da doença e identificando as mulheres cujas gestações têm os piores resultados, em quem uma terapia pode ser mais vantajosa. Os resultados também permitirão um melhor aconselhamento de casais com gravidezes afetadas, além de fornecer um valioso recurso para futuras pesquisas sobre as causas de RCIU (SPENCER, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

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

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

- Peso dos fetos.
- Número de fetos por ninhada.
- Peso das placentas.

3.2.3 Verificar a ocorrência de complicações hemorrágicas relacionadas a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas.

3.2.4 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre os seguintes índices de Dopplerfluxometria da artéria cerebral média (ACM) fetal:

- Velocidade de pico sistólico (VPS).
- Índice de pulsatilidade (IP).
- Índice de resistência (IR).

- Formato de onda espectral.

3.2.5 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre os seguintes índices de Dopplerfluxometria do ducto venoso (DV) fetal:

- Velocidade de pico sistólico (VPS).
- Índice de pulsatilidade (IP).
- Índice de resistência (IR).
- Formato de onda espectral.

3.2.6 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre os seguintes índices de Dopplerfluxometria da artéria umbilical (AU) fetal:

- Velocidade de pico sistólico (VPS).
- Índice de pulsatilidade (IP).
- Índice de resistência (IR).
- Formato de onda espectral.

3.2.7 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre os seguintes índices de Dopplerfluxometria das artérias uterinas:

- Velocidade de pico sistólico (VPS).
- Índice de pulsatilidade (IP).
- Índice de resistência (IR).
- Formato de onda espectral.

3.2.8 Avaliar os efeitos da exposição a drogas anticoagulantes, enoxaparina e heparina não fracionada, em doses profiláticas e terapêuticas sobre os seguintes parâmetros para osteopenia em fêmur das ratas:

- Peso do fêmur.
- Peso seco do fêmur.
- Comprimento do fêmur.
- Análise microscópica da densidade trabecular óssea.

4 MATERIAL, ANIMAIS E MÉTODOS

O presente trabalho fez parte de projeto da linha de pesquisa de efeitos osteopênicos, teratogênicos e sobre taxas de fertilidade de ratas *Wistar* expostas a drogas anticoagulantes em prenhez experimental e foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) com protocolo nº 282 de 11/03/2011 (Anexo A). Desta linha de pesquisa originaram-se uma dissertação e a presente tese em continuidade.

Realizou-se estudo experimental realizado no laboratório de técnica cirúrgica e cirurgia experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande, com a utilização de 55 animais da espécie *Rattus norvegicus* da variedade *Wistar*, sendo 50 fêmeas e cinco machos, com peso inicial entre 160g e 250g provenientes do biotério central do campus de Campo Grande da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O tamanho amostral mínimo necessário para que os resultados se tornassem representativos foi analisado no momento inicial, levando em consideração o delineamento do estudo, o erro tipo 1 em 5% ($\alpha=0,05$) e o poder estatístico de 80% ($1-\beta=0,20$). A análise do cálculo amostral sugeriu um tamanho mínimo de aproximadamente 42 animais para que os dados fossem representativos no tocante a pesquisa dos efeitos osteopênicos e aproximadamente cinco fetos por animal para a análise da dopplerfluxometria. Com objetivo de minimizar perdas, optou-se por utilizar dez animais em cada grupo e seis fetos por animal, o que totalizou 50 fêmeas e 300 fetos.

Em relação ao número de machos optou-se por um macho para cada cinco fêmeas, conforme modelo descrito por Figueiró-Filho *et al.* (2002) e preconizado por Almeida (1999) e Almeida *et al.* (2000).

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

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

Os medicamentos anticoagulantes mais utilizados durante a gestação, quando indicados em casos de tromboembolismo venoso, ou em presença de válvulas cardíacas não biológicas são a heparina sódica (heparina não fracionada ou HNF) e a enoxaparina (Heparina de baixo peso molecular ou HBPM), porque os anticoagulantes orais, como a varfarina, tem seu uso preferido fora do estado gravídico, em função de sua bem conhecida relação com comorbidades materno-fetais, por atravessar a barreira placentária.

Os medicamentos utilizados neste experimento foram fornecidos pela Farmácia do Núcleo Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e suas doses foram padronizadas em relação à literatura, sendo as mesmas empregadas em seres humanos ajustadas ao peso (SARDINHA, SILVESTRE, 2006; THOMAS; VILLAS, 2006; CURCELLY, 2005; SHAUGHNESSY, 1999). Como o peso dos animais é bem inferior ao do ser humano realizou-se diluição das apresentações farmacêuticas da

enoxaparina e da HNF para ficar compatível com volume de administração adequado às ratas (PAIVA, 2005). Desta forma, as doses e vias de administração foram as seguintes:

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

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

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

Quadro 2: Grupos e drogas testadas

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

Forma de administração: subcutânea.

Tempo de tratamento: 20 dias, sendo dia 1, o dia “zero” da prenhez.

* Utilizou-se um volume médio correspondente ao dos demais grupos, de acordo com o peso animal (PAIVA, 2005)

Os animais permaneceram em gaiolas adequadas, climatizadas, abrigados em temperatura ambiente (25°C) e umidade entre 50-60% e com respeito à luminosidade do seu ciclo natural em estantes próprias com este controle, disponíveis no Biotério da universidade federal de Mato Grosso do Sul, além de água e comida *ad libitum*. O período de adaptação dos animais em seus novos ambientes antes da fase experimental foi de sete dias por grupo de animais em cada gaiola. Os machos foram acondicionados em uma gaiola separada, também com um período de adaptação de sete dias e em mesmas condições alimentares e ambientais que as fêmeas.

Após o período de adaptação, iniciou-se o programa de acasalamento. Diariamente, pela manhã, após a limpeza das gaiolas realizava-se a observação à fresco através de microscopia óptica de uma lâmina obtida por esfregaço vaginal. Nesta observação colpocitológica procurava-se saber em qual fase do ciclo estral cada rata se encontrava (CAMANO, 1968). O ciclo estral das ratas dura entre quatro e seis dias e é classificado em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. A fêmea se encontra receptiva ao macho apenas na fase do estro (FIGUEIRÓ-FILHO, 2002). Por isso, quando se identificava uma rata no estro, esta era separada para receber o macho naquele dia. Na maioria das gaiolas as ratas tiveram ciclos concordantes, ou seja, numa mesma gaiola se encontrava mais de uma rata na mesma fase do ciclo.

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

Diariamente, as ratas eram pesadas e de acordo com seu peso, checava-se a dose a ser administrada. Os experimentos foram realizados pela manhã e ao final da tarde, com intervalo de 12 horas, correspondente ao intervalo de aplicação das medicações em alguns grupos.

A via subcutânea utilizada nos ratos foi a nuca ou o dorso do animal, após contenção manual suave (PAIVA, 2005). O volume aplicado não ultrapassou o limite estabelecido na literatura para uso da via subcutânea em ratos, que é de 4mL/Kg, o que corresponde em média a um volume na nuca ou dorso de 0,6mL num rato de 150g e de

1,2mL num rato de 300g (SILVA; PESGRAVE, 2008; PAIVA, 2005). A diluição das drogas com a dose necessária feita para obedecer este volume máximo.

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

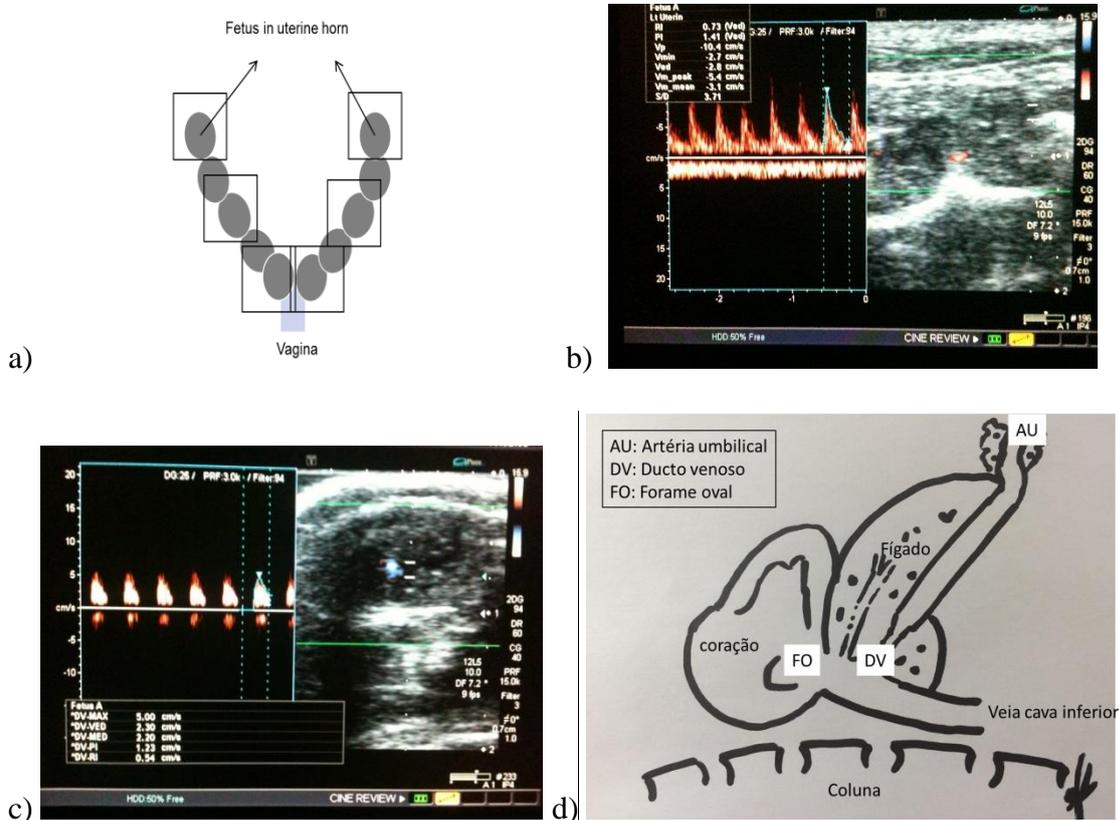
No 18º dia de prenhez realizou-se o estudo ultrassonográfico dos fetos, uma vez que este dia é escolhido na maioria dos trabalhos para evitar ao máximo a perda por nascimentos, seja pré-termo ou por erro na data de prenhez (LI, 2015; CHEEMA, 2012). Para tanto, cada rata foi anestesiada com xilazina (5-10mg/kg) e quetamina (50-75mg/kg) por via intraperitoneal e então submetidas a aplicação de grande quantidade de gel de contato, sendo o gel aquecido previamente com o aparelho aquecedor de gel a seco (Dantex-Brasil), cedido por clínica particular (Angiovida diagnósticos vasculares), com objetivo de evitar alterações hemodinâmicas de vasoconstrição por temperatura.

Utilizou-se neste trabalho o aparelho de ultrassom SSA-660A Xario™ (Toshiba-Japão) e transdutor linear multifrequencial de 4.8 a 11 MHz, cedido de clínica particular (Maternalis- medicina fetal). O estudo ultrassonográfico foi realizado em antessala com controle de temperatura em 25°C, localizada ao lado da sala de acondicionamento dos animais no laboratório de técnica cirúrgica e cirurgia experimental da universidade federal de Mato Grosso do Sul. O controle de temperatura é essencial para não afetar a hemodinâmica uma vez que pode influenciar vasoconstrição ou vasodilatação (SALLES-CUNHA, 2016). Iniciou-se cada estudo com varredura do transdutor na parede abdominal anterior à partir da borda superior pélvica do animal para

identificar a bexiga seguindo então com a sonda em varredura cranial para localizar e identificar os cornos uterinos e fetos em secção axial. Após a identificação fetal, sua viabilidade foi confirmada com a observação dos batimentos cardíacos fetais e foi decidido analisar o primeiro e o último feto de cada corno uterino e um intermediário aleatoriamente (Figura 8). Com uma visão sagital do feto foi identificado em cada um as artérias cerebrais médias, o ducto venoso e a artéria umbilical, posicionando um volume de amostra do Doppler colorido seguido de Doppler pulsado.

Empregaram-se os seguintes modos de estudo: Doppler contínuo, Doppler pulsado, Doppler colorido e Doppler de amplitude. Todos os exames foram realizados pelos mesmos examinadores pesquisadores.

Figura 8. Representação do desenho de estudo da dopplerfluxometria fetal e exemplos de imagens obtidas.



(a) Desenho do estudo: amostras fetais nos cornos uterinos. Neste modelo, escolheu-se o primeiro e último feto e um em porção intermediária em cada corno uterino. (b) Exemplo de Doppler pulsado da artéria uterina e (c) do ducto venoso (note volume de amostra próximo ao coração, em topografia hepática). (d) Desenho esquemático da anatomia de identificação dos principais vasos sanguíneos abordados no estudo.

Para a exposição do Doppler pulsado, utilizou-se uma frequência de 7,2-10,2 MHz e um *frame rate* de 19,5. A profundidade foi de dois centímetros, com caixa de cor de um centímetro tanto de largura quanto de altura e padrão bicolor do fluxo com extremos de aproximação e afastamento azul e vermelho, ajustados ao máximo para corresponder a direção dos fluxos arteriais e venosos. O ganho bidimensional foi ajustado em 90%, o

ganho de cor foi ajustado em 40%, o PRF foi ajustado entre 10-15cm /s e o volume da amostra 0,5 mm. O ângulo de insonação foi mantido em $<60^\circ$.

O reconhecimento da artéria cerebral média, ducto venoso e artéria umbilical ocorreram pela análise das características da forma de onda do fluxo sanguíneo da amostra detectada no modo de cor na topografia cerebral, hepática e região ventral do abdome. Após a identificação do vaso específico obtive-se automaticamente as medidas da curva de velocidade: velocidade pico sistólica, índice de pulsatilidade e índice de resistência. Quando não foi possível obter a medida de forma automática por alguma interferência ou artefato procedeu-se a aferição manual.

Após 20 dias de gestação, os animais foram submetidos a laparotomia mediana e remoção fetal e placentária, com contagem e peso de cada um.

Na manhã do 20º dia de gestação submeteu-se cada rata ao procedimento cirúrgico de laparotomia com objetivo de retirada de órgãos e dos fetos.

Para a realização da laparotomia, realizava-se a indução pré-anestésica com midazolam 4mg/Kg IM, seguida de anestesia geral com xilazina (5-10 mg/Kg) com adição de quetamina (50-75 mg/Kg) por via intraperitoneal (IP). Em seguida ao procedimento cirúrgico, realizou-se eutanásia com Pentobarbital IP na dose de 100mg/Kg (SILVA; PESGRAVE, 2008; PAIVA, 2005).

As etapas experimentais contemplaram: imediatamente após a anestesia geral do animal, procedeu-se a realização da laparotomia. Após rápido inventário da cavidade, isolaram-se os cornos uterinos e os ovários (Fig. 9), retirando-os em bloco com secção da base uterina e dos ligamentos uterinos e apendiculares ovarianos (Fig. 10). Realizou-se a abertura uterina e uma vez aberto o útero, eram contados os fetos e após retirados, fazendo-se a anotação do sexo, pesagem dos mesmos e de suas respectivas placentas (Fig. 11).

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

Figura 9– Fotografia de uma das ratas onde se demonstra os cornos uterinos com a presença dos fetos e placentas com 20 dias de prenhez.

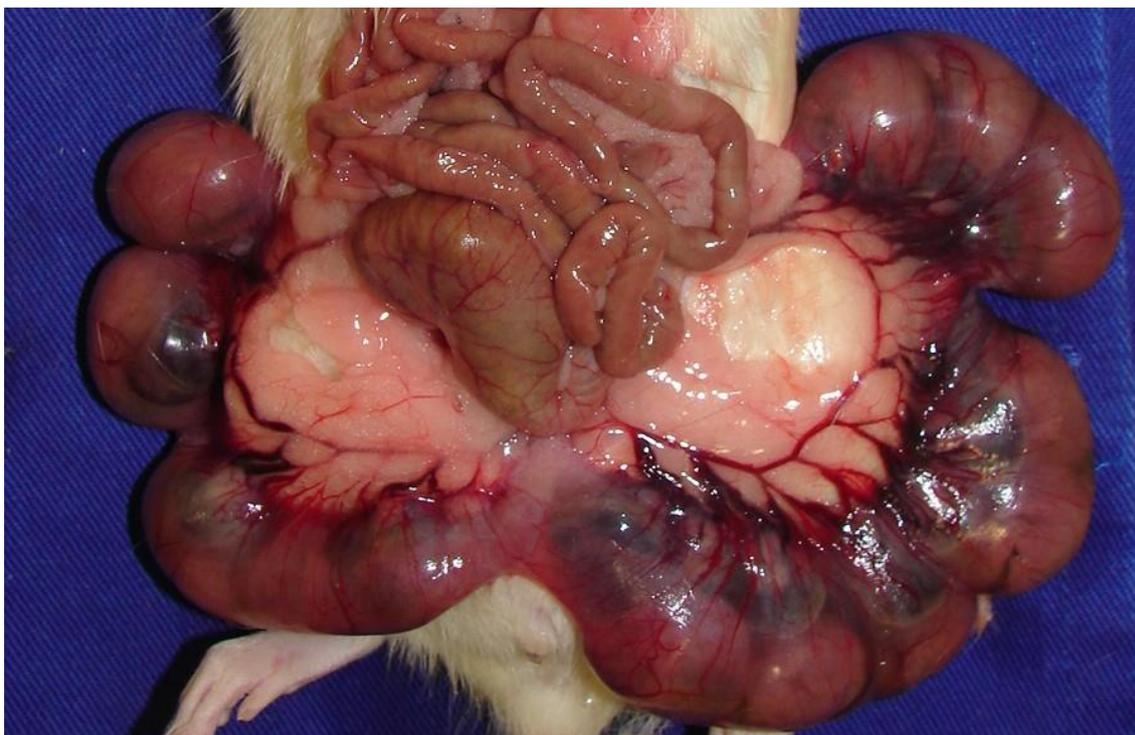


Figura 10 – Fotografia dos cornos uterinos retirados “em bloco” de uma rata da pesquisa com a presença de fetos e respectivas placentas com 20 dias de prenhez.

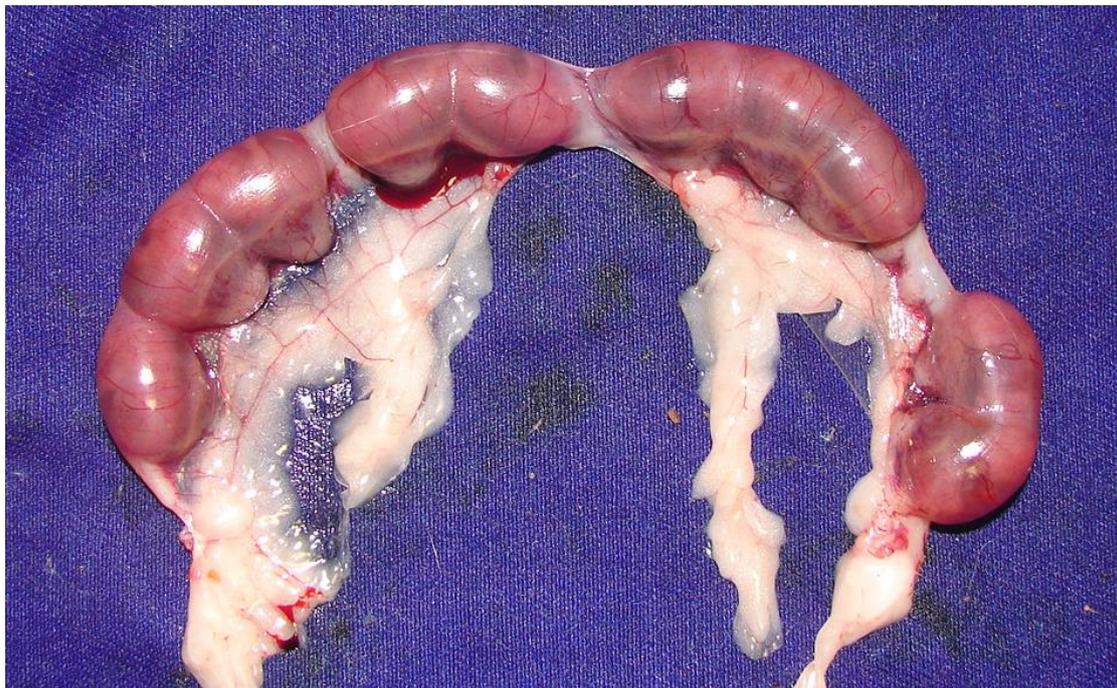
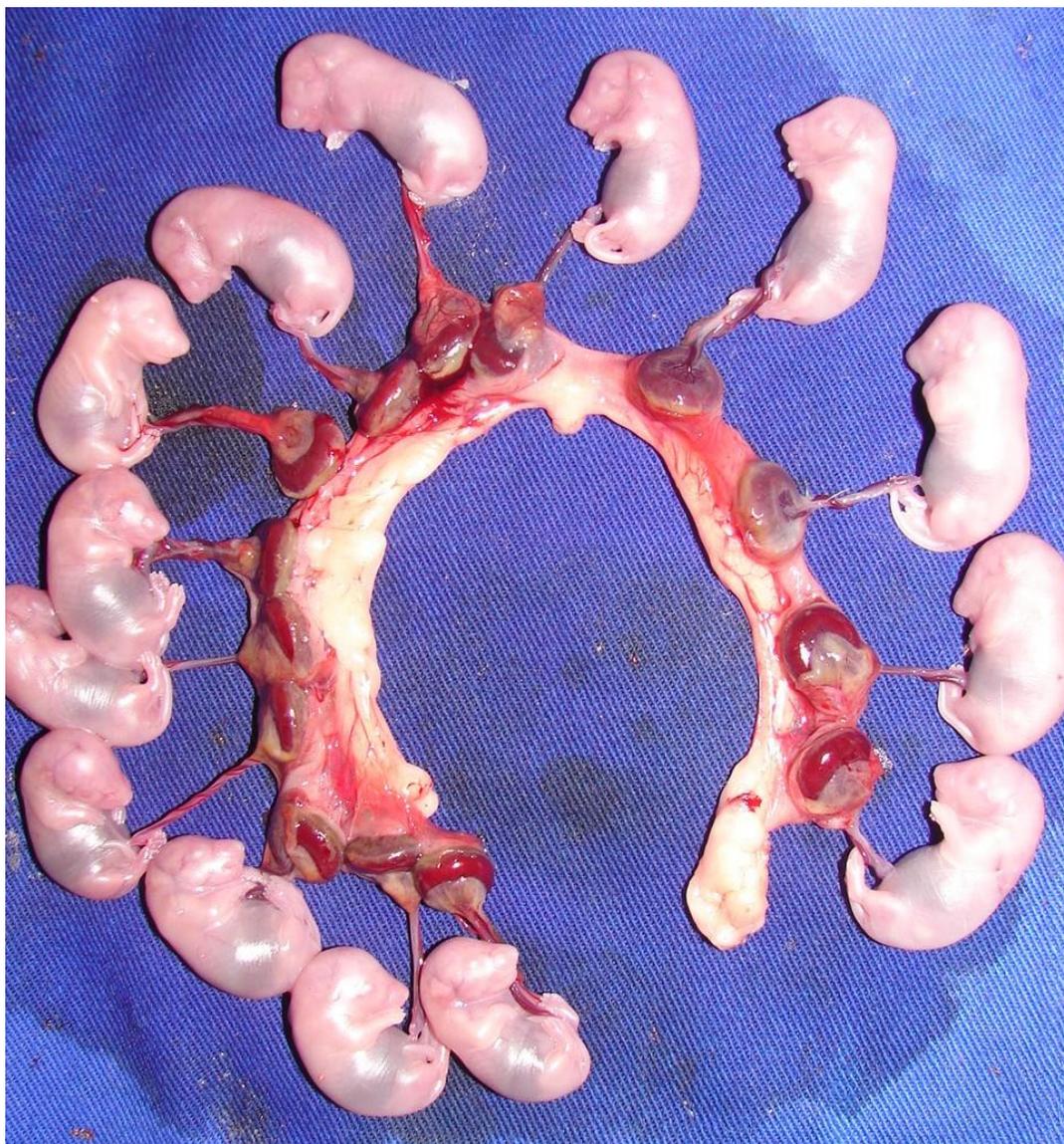


Figura 11 – Fotografia dos cornos uterinos abertos de uma rata da pesquisa evidenciando os fetos, placentas, sítios de implantação e corpos lúteos após 20 dias de prenhez.



Após laparotomia iniciava-se o processo de coleta do fêmur. Escolhia-se em abordar a coxa direita ou esquerda, após primeiro sorteio aleatório para definir a ordem, em cada grupo, sendo que a metade dos animais tivessem o fêmur direito dissecado e a outra metade o fêmur esquerdo. Iniciava-se com uma incisão longitudinal desde o ligamento inguinal até o joelho (figura 12) seguia-se com abertura por planos até identificação da aponeurose muscular e veia safena magna. Em seguida, dissecava-se lateralmente à veia safena magna com divulsão muscular até atingir o fêmur com o auxílio de uma pinça Kely

de ponta curva e comprimento de 12cm (figura 13). Após identificação do fêmur realizava-se sua dissecação do plano muscular com bisturi frio cabo nº 3 e lâmina 15 até total isolamento do osso dos músculos com a manutenção da integridade das cápsulas articulares do joelho e articulação coxo-femoral. Na articulação do joelho procedia-se à secção do ligamento patelar seguido da desarticulação neste ponto e continuava-se com dissecação lateral do fêmur até promover a abertura da cápsula articular coxo-femoral e luxação da cabeça do fêmur completando a dissecação posterior separando os elementos músculo-tendinosos do osso até completa extração do fêmur (figura 14). Na dissecação do fêmur tomou-se o cuidado em preservar região epifisária.

Após retirada do fêmur, o mesmo era submetido à remoção de gordura e tecidos conjuntivos com desidratação ao etanol seguido de aplicação de éter dietílico, sendo então, medido com paquímetro e obtido seu peso em balança digital de precisão. Em seguida, cada fêmur foi então embebido com gaze e soro fisiológico e congelado a -20°C até análise posterior.

Figura 12. Fotografia de uma das ratas onde se evidencia a incisão longitudinal em coxa do ligamento inguinal até joelho. (Nota-se que para fins de ilustração, optou-se neste animal em iniciar pela extração do fêmur antes da laparotomia).



Figura 13. Fotografia de uma das ratas durante dissecção muscular até identificação e dissecção do fêmur.



Figura 14. Fotografia de uma das ratas onde se observa o final da extração completa do fêmur.



Após remoção do congelador foram reidratados com soro fisiológico durante quatro horas em temperatura ambiente, conforme descrito por Khajuria *et al* (2015), sendo então colocados em formol tamponado à 10%, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, descalcificado em solução de ácido fórmico/citrato de sódio, pesados novamente e incluídos em parafina, sendo depois processados rotineiramente para estudo histológico em microscopia de luz (PINTO, 2005). O processamento histológico após inclusão em parafina seguiu-se de três cortes, de cada fêmur, com quatro micrômetros ($4\mu\text{m}$) de espessura de forma seriada em micrótomo rotativo dotado de navalha descartável, sendo então montados sobre lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina no laboratório de uma clínica particular de Campo Grande. Conforme modelo apresentado por Pinto *et al.* (2005) e Mahl *et al.* (2009) para cálculo da densidade ocupada

pelo osso trabecular, obteve-se uma imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico equipado com câmara digital. As imagens foram digitalizadas em 300 dpi e salvas em formato BMP (Bitmap for Windows), importadas para o programa Adobe Photoshop CS (versão 7.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 17 polegadas, com aumento final de 50 vezes. Para se obter um percentual da área de densidade óssea trabecular do fêmur coletado dos animais aplicou-se o método descrito por Pinto *et al.* (2005) de contagem de pontos coincidentes ao cruzamento de linhas de uma gráticula e pelo histograma de área conforme método de Mahl *et al.* (2009). A gráticula se obtinha por intermédio de uma sobreposição de linhas traçadas em cima de uma imagem no monitor composta por 494 interseções, distando 1cm cada uma, sendo uma área de 100 interseções isolada para a avaliação. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabécula óssea ou ao espaço intertrabecular. Realizaram-se três repetições, sendo, assim, 65 para cada animal, computados um total de 300 pontos, perfazendo, portanto, 3000 pontos por grupo de 10 animais de cada tratamento. A segunda análise procedeu com a obtenção dos valores médios e de desvio-padrão da densidade óssea e com emprego da função histograma deste programa, por um observador previamente treinado em usar este recurso, porém, sem saber para qual grupo pertencia a imagem em avaliação (Figura 15).

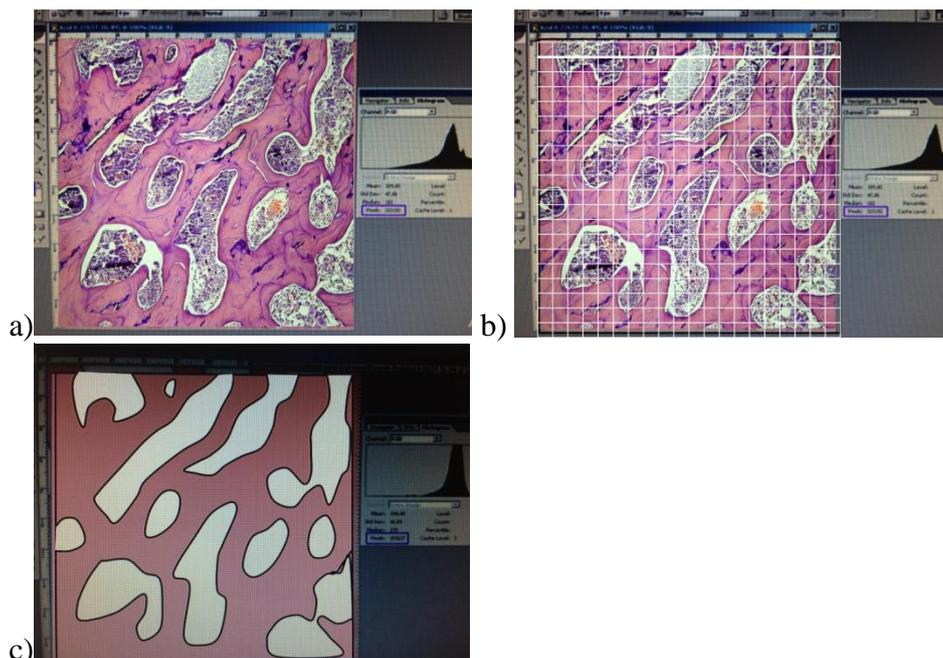


Figura 15. Exemplo de imagens de processamento histológico em lâminas coradas por hematoxilina-eosina para análise. A) Imagem de área trabecular para análise no programa. B) Imagem da área trabecular com projeção da graticula para contagem dos pontos de intersecção. C) Área total recortada da imagem de área trabecular obtida pela ferramenta histograma.

Para análise estatística os dados quantitativos foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram apresentados como média±desvio-padrão, e os dados sem normalidade foram apresentados como mediana±diferença interquartílica.

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

Para as variáveis de frequência de eventos hemorrágicos foi aplicado o teste exato de Fisher.

Para as variáveis paramétricas de distribuição não normal como os índices de dopplervelocimetria utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar medianas em duas amostras independentes e o teste de Kruskal-Wallis para comparar medianas de três ou mais amostras independentes, sendo indicado pós teste de Dunn se o valor de p fosse significativo.

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de “ p ” bicaudal foi menor que 0,05. Para a realização dos cálculos foi utilizado o *software* GraphPad Prism® versão 3.00.

6 RESULTADOS

Os dados foram submetidos à análise estatística e as variáveis com distribuição normal estão expressas na forma de média \pm 1 desvio padrão (DP) ($\mu. \pm 1 DP$). As variáveis não paramétricas como os índices de dopplervelocimetria, estão expressas na forma de mediana \pm 1 diferença interquartílica. Seguem abaixo os resultados do presente estudo:

Quanto à variável ganho de peso, através dos dados expressos nas tabelas 1, 2 e 3, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de ganho de peso diário após 7, 14 e 20 dias de prenhez respectivamente, tanto em relação de cada grupo com o grupo controle (onde se utilizou o teste *t* de student) como também quando se relacionou cada grupo entre si (neste caso se usou ANOVA).

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

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

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

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

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

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

n.s. Não significativo

Tabela 3 – Médias do ganho ponderal diário após 20 dias de prenhez

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

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

n.s. Não significativo

Quando se observa a tabela 4, onde são comparados os ganhos ponderais de cada grupo nos diversos períodos de prenhez, observa-se que todos os animais em todos os grupos aumentaram de peso significativamente durante a prenhez de forma satisfatória,

sendo que apenas no período de 7 a 14 dias o grupo IV apresentou aumento significativo enquanto os demais não. Já comparando entre 14 e 20 dias e 7 e 20 dias, todos os grupos apresentaram aumento ponderal significativo.

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

Grupos	Ganho de peso (g) (μ . \pm 1 DP)			<i>P</i> *		
	0-7 dias	8-14 dias	15-20 dias	7 d X14 d	14 d X 20 d	7 d X 20 d
Controle	6,98 \pm 0,87	7,04 \pm 0,82	8,22 \pm 1,32	n.s.	0,034	0,023
II	6,75 \pm 0,69	6,92 \pm 0,78	8,19 \pm 1,08	n.s.	0,018	<0,01
III	6,82 \pm 1,13	6,98 \pm 0,83	7,92 \pm 1,51	n.s.	0,042	0,031
IV	6,94 \pm 1,31	7,23 \pm 0,35	8,27 \pm 1,25	0,045	0,027	<0,001
V	6,75 \pm 0,98	7,13 \pm 0,69	7,94 \pm 1,42	n.s.	0,021	0,022

* $p < 0,05$ ANOVA. n: 50. n.s. Não significativo

Ao se analisar outras características da ninhada com os efeitos das drogas anticoagulantes empregadas neste estudo sobre o desenvolvimento perinatal, como peso dos fetos e das placentas construíram-se as tabelas 5 a 6.

Após 20 dias de prenhez, não se observaram diferenças estatisticamente significativa dos pesos dos fetos entre cada grupo e o grupo controle ou os grupos entre si (Tabela 5), assim como diferenças entre os pesos das placentas (Tabela 6).

Tabela 5 – Médias do peso dos fetos após 20 dias de prenhez

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

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

*ANOVA (comparação dos grupos entre si). n: 631.

n.s. Não significativo

Tabela 6 – Médias do peso das placentas após 20 dias de prenhez

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

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

*ANOVA (comparação dos grupos entre si). n: 631 n.s. Não significativo

Quando se comparou o número de fetos por animal prenhe, não se observou diferenças significativas no tamanho da ninhada entre os grupos com o grupo controle e entre si, como apresentado na tabela 7.

Tabela 7 – Médias do número de fetos/animal após 20 dias de prenhez

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

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

*ANOVA (comparação dos grupos entre si). n: 631.

Sobre a frequência de eventos hemorrágicos, houve incidência significativamente maior nos grupos expostos a doses terapêuticas de drogas anticoagulantes (grupos III e V) em comparação com o grupo controle e os demais, como se observa na tabela 8. Todos os eventos hemorrágicos aconteceram entre um e quatro dias antes da cirurgia programada (entre 17 a 20 dias de gestação). Não houve perdas na amostra. Os sangramentos notificados foram: sangue na região genital (dois casos), melena (um caso), sangue em cavidade oral/ gengiva (dois casos) e hematoquezia (um caso). Nestes casos, suspendeu-se por 24h a medicação e reiniciada em dose entre 10% a 20% menor do que a anterior administrada.

Tabela 8 – Frequência de animais que apresentaram eventos hemorrágicos após 20 dias de prenhez

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

* $p < 0,05$ teste exato de Fisher. n:50. n.s. Não significativo

Não houve dificuldade técnica para a insonação dos vasos. A janela acústica foi adequada com excelente visualização dos vasos, bilateralmente, em 100% dos casos, nos grupos estudados. O tempo médio do exame de cada rata foi de $37,3 \pm 12,1$ minutos e não houve diferença significativa entre tempo do exame entre os grupos.

Em relação às morfologias das curvas, não se observaram curvas com diástole zero ou reversa no presente estudo em relação aos vasos fetais estudados.

O número médio de fetos por rata, por corno uterino e em comparação entre ambos os cornos uterinos não apresentou diferença significativa, assim como entre os grupos, conforme pode se observar na tabela 9.

Tabela 9. Número de fetos/ animal e fetos/corno uterino após 20 dias de gestação.

Grupo		Número de fetos/animal média \pm 1 DP	Número de fetos/ corno uterino direito. média \pm 1 DP	Número de fetos/ corno uterino esquerdo. média \pm 1 DP	p*
I.	Controle	12.82 \pm 2.34	6,32 \pm 0.24	6,18 \pm 0.37	--
II.	Enoxaparina, dose profilática	11.98 \pm 1.78	6,05 \pm 0.41	5,98 \pm 0.23	n.s.
III.	Enoxaparina, dose terapêutica	12.23 \pm 1.94	6,17 \pm 0.35	6,21 \pm 0.25	n.s.
IV.	HNF, dose profilática	12.57 \pm 2.03	6,12 \pm 0.17	6,14 \pm 0.34	n.s.
V.	HNF, dose terapêutica	12.34 \pm 1.56	6,25 \pm 0.14	6,08 \pm 0.18	n.s.
		n: 631	n:319	n:312	

*p<0.05 Teste t-Student (comparação grupos vs. controle) e ANOVA (comparação entre os grupos). n.s. – não significante; DP – desvio padrão.

Durante a pesquisa o ganho ponderal materno do início até o final da gestação, em média, não teve diferença estatística entre os grupos (Tabela 4). Do mesmo modo, não se observou significância comparando a média de peso dos fetos e das placentas, como exposto pela tabela 10.

Tabela 10. Ganho de peso materno diário na última semana de prenhez, peso fetal e peso placentário após 20 dias de gestação.

	Grupo	Ganho de peso materno diário na última semana de prenhez (g) média ± 1 DP	p*	Peso fetal (g) média ± 1 DP	p*	Peso da placenta (g) média ± 1 DP	p*
VI.	Controle	8.22±1.32	--	5.62±0.78	--	0.83±0.18	--
VII.	Enoxaparina, dose profilática	8.19±1.08	n.s.	6.01±0.24	n.s.	0.81±0.15	n.s.
VIII.	Enoxaparina, dose terapêutica	7.92±1.51	n.s.	5.83±0.62	n.s.	0.83±0.22	n.s.
IX.	HNF, dose profilática	8.27±1.25	n.s.	5.67±0.55	n.s.	0.84±0.17	n.s.
X.	HNF, dose terapêutica	7.94±1.42	n.s.	5.72±0.81	n.s.	0.82±0.23	n.s.
		n: 50		n: 631		n: 631	

*p<0.05 Teste t-Student (comparação grupos vs. controle) e ANOVA (comparação entre os grupos). n.s. – não significante; DP – desvio padrão.

Conforme aplicação do teste de Shapiro-Wilk, os dados quantitativos relativos à velocidade de pico sistólico (VPS), índice de resistência (IR) e índice de pulsatilidade (IP) não tiveram distribuição normal e para tanto seus resumos na tabela 11 e 12 estão expressos em medianas e diferenças interquartílicas.

A comparação das medianas de VPS, IR e IP entre cada grupo e o grupo controle assim como entre todos os grupos não mostrou diferenças significativas em cada vaso estudado pela dopplerfluxometria que foi a artéria cerebral média, o ducto venoso e a artéria umbilical, cujos resultados estão resumidos na tabela 11.

Tabela 11. Comparação dos índices de dopplerfluxometria fetal das ratas *Wistar* expostas à enoxaparina e heparina não fracionada, conforme cada vaso estudado.

Vasos estudados	Índices	Grupos					p valor
		I (n=60)	II (n=60)	III (n=60)	IV (n=60)	V (n=60)	
ACM	VPS	6,32±1.25	7,05±1.34	6,14±1.15	6,95±1.22	6,27±1.47	n.s.
	IR	0,58±0.11	0,62±0.19	0,48±0.21	0,55±0.11	0,63±0.13	n.s.
	IP	1,62±0.35	1,83±0.39	1,45±0.28	1,71±0.38	1,74±0.27	n.s.
DV	VPS	10,3±1.74	11,3±1.52	15,1±3.43	12,3±1.65	11,3±1.67	n.s.
	IR	0,54±0.15	0,53±0.28	0,51±0.79	0,55±0.45	0,49±0.35	n.s.
	IP	1,23±0.45	1,28±0.31	1,24±0.42	1,18±0.39	1,27±0.47	n.s.
AU	VPS	10,7±3,41	10,2±3,63	11,5±3,58	9,8±3,78	11,4±2,91	n.s.
	IR	0,48±0.21	0,45±0.19	0,42±0.33	0,51±0.29	0,47±0.34	n.s.
	IP	1,42±0.68	1,34±0.55	1,45±0.72	1,47±0.81	1,79±0,11	n.s.

ACM: Artéria cerebral média; DV: Ducto venoso; AU: Artéria Umbilical; VPS: Velocidade de pico sistólico (cm/seg); IR: Índice de Resistência; IP: Índice de Pulsatilidade.

*p<0.05 Teste de Mann Whitney (comparação grupo versus controle) e teste de Kruskal-Wallis (comparação entre os grupos). mediana ± diferença interquartilica. n.s. – não significante.

Por fim, ao relacionar as medianas da VPS, IR e IP das artérias uterinas direita e esquerda, não se observou significância estatística entre cada grupo e o grupo controle, do mesmo modo como entre os grupos entre si. Estes resultados estão resumidos na tabela 12.

Tabela 12 Comparação dos índices de dopplerfluxometria das artérias uterinas das ratas *Wistar* expostas à enoxaparina e heparina não fracionada.

Vasos estudados	Índices	Grupos					p valor
		I (n=10)	II (n=10)	III (n=10)	IV (n=10)	V (n=10)	
AUD	VPS	10,3±1.74	11,3±1.52	15,1±3.43	12,3±1.65	11,3±1.67	n.s.
	IR	0,54±0.15	0,53±0.28	0,51±0.79	0,55±0.45	0,49±0.35	n.s.
	IP	1,23±0.45	1,28±0.31	1,24±0.42	1,18±0.39	1,27±0.47	n.s.
AUE	PSV	10,3±1.74	11,3±1.52	15,1±3.43	12,3±1.65	11,3±1.67	n.s.
	RI	0,54±0.15	0,53±0.28	0,51±0.79	0,55±0.45	0,49±0.35	n.s.
	PI	1,23±0.45	1,28±0.31	1,24±0.42	1,18±0.39	1,27±0.47	n.s.

AUD: Artéria uterina direita; AUE: Artéria uterina esquerda; VPS: Velocidade de pico sistólico (cm/seg); IR: Índice de Resistencia; IP: Índice de Pulsatilidade.

*p<0.05 Teste de Mann Whitney (comparação grupo versus controle) e teste de Kruskal-Wallis (comparação entre os grupos). mediana ± diferença interquartilica. n.s. – não significante.

n: total de vasos por grupo, sendo neste caso 10 para cada grupo, para cada vaso, com total de 100 vasos analisados

Para analisar possíveis efeitos osteopênicos, utilizou-se o peso do fêmur, seu comprimento e proporção de osso trabecular. Foram analisados 50 fêmures, sendo metade do lado direito e metade do lado esquerdo, em cada grupo, definidos por sorteio sua sequência de extração, totalizando 50 ossos.

Após extração do fêmur com remoção de gordura e desidratação obteve-se o peso seco, onde não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias de peso seco femorais entre o grupo controle e grupos experimentais e estes entre si (Tabela 13).

Tabela 13 – Peso femoral seco após extração, desidratação e remoção de gordura.

Grupo	Peso seco fêmur (mg) (μ. \pm 1 DP)	<i>p</i>*
I- Controle	631,81 \pm 7,9	---
II- Enoxaparina, dose profilática	618,21 \pm 10,2	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	624,37 \pm 11,4	n.s.
IV- HNF, dose profilática	630,14 \pm 9,9	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	622,45 \pm 10,3	n.s.

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

*ANOVA (comparação dos grupos entre si). n: 50

n.s. Não significativo

Da mesma forma, não se observaram diferenças significativas entre os pesos femorais pós descongelamento e reidratação entre os grupos e o controle e entre os grupos entre si (tabela 14).

Tabela 14 – Peso femoral após descongelamento e reidratação.

Grupo	Peso fêmur (mg) ($\mu. \pm 1 DP$)	<i>p</i>*
I- Controle	619,21 \pm 5,6	---
II- Enoxaparina, dose profilática	608,51 \pm 8,3	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	614,79 \pm 9,4	n.s.
IV- HNF, dose profilática	617,49 \pm 8,1	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	612,76 \pm 8,7	n.s.

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

*ANOVA (comparação dos grupos entre si). n: 50

n.s. Não significativo

Ao se comparar os pesos médios dos fêmures antes e depois do congelamento não se observou redução significativa do peso médio nos grupos (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparação do peso femoral médio antes e após congelamento.

Grupo		Pré-congelamento	Pós descongelamento	
			Peso seco fêmur (mg) ($\mu. \pm 1$ DP)	Peso fêmur pós descongelamento (mg) ($\mu. \pm 1$ DP)
I-	Controle	631,81±7,9	619,21±5,6	n.s.
II-	Enoxaparina, dose profilática	618,21±10,2	608,51±8,3	n.s.
III-	Enoxaparina, dose terapêutica	624,37±11,4	614,79±9,4	n.s.
IV-	HNF, dose profilática	630,14±9,9	617,49±8,1	n.s.
V-	HNF, dose terapêutica	622,45±10,3	612,76±8,7	n.s.

* $p < 0,05$ “t” Student (comparação médias antes e depois do congelamento) n: 50.
n.s. Não significativo

Também não se observaram diferenças significativas entre os comprimentos femorais médios das ratas expostas aos anticoagulantes em doses profilática e terapêutica em relação ao grupo controle, assim como entre si (Tabela 16).

Tabela 16 – Comprimento femoral médio das ratas nos grupos controle e experimentais.

Grupo	Comprimento médio fêmur (mm) (μ. \pm 1 DP)	<i>p</i>*
I- Controle	40,24 \pm 1,7	---
II- Enoxaparina, dose profilática	40,37 \pm 2,3	n.s.
III- Enoxaparina, dose terapêutica	39,85 \pm 4,6	n.s.
IV- HNF, dose profilática	40,33 \pm 3,4	n.s.
V- HNF, dose terapêutica	40,18 \pm 3,1	n.s.

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

*ANOVA (comparação dos grupos entre si). n: 50

n.s. Não significativo

Quanto a análise microscópica do percentual de osso trabecular, obteve-se uma porcentagem por dois diferentes métodos, sendo um por uma seção de pontos de intersecção de linhas e outro por área de histograma por subtração de imagem.

Ao se comparar as médias de área percentual do osso trabecular pelo método de amostra de pontos de intersecção, não se observaram diferenças significativas entre cada grupo em relação ao controle (teste t de student) nem entre cada grupo comparando entre si com os demais (Análise de variância) conforme se observa na tabela 17.

Tabela 17. Comparação entre os grupos quanto ao percentual médio de área do osso trabecular por campo.

Grupo	n	Média % área	Desvio-padrão	<i>p</i> *
I	10	70,69	±5,72	-
II	10	68,18	±5,94	n.s.
III	10	70,15	±4,78	n.s.
IV	10	67,95	±5,85	n.s.
V	10	68,27	±5,54	n.s.

* $p < 0.05$ Teste t-Student (comparação grupos vs. controle) e ANOVA (comparação entre os grupos). n.s. – não significante; DP – desvio padrão.

Por fim, ao se analisar os valores percentuais médios de área trabecular óssea com o método do histograma de área, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e o controle, do mesmo modo que entre os grupos (Tabela 18).

Tabela 18. Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais em ratas prenhes expostas à enoxaparina e HNF em doses profilática e terapêutica.

Grupo	n	Média	±	Desvio-padrão	<i>p</i> *
I	10	60,07	±	2,31	-
II	10	61,13	±	2,64	n.s.
III	10	59,78	±	2,47	n.s.
IV	10	60,21	±	2,89	n.s.
V	10	59,62	±	3,16	n.s.

* $p < 0.05$ Teste t-Student (comparação grupos vs. controle) e ANOVA (comparação entre os grupos). n.s. – não significante; DP – desvio padrão.

7 DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho decorre da necessidade de se aprofundar o conhecimento da segurança do emprego das drogas anticoagulantes HNF e enoxaparina no período gestacional.

Sua utilização na gestação teve crescimento exponencial na última década com aumento do rastreamento diagnóstico de trombofilias e outras situações de risco como a pré-eclâmpsia associado com os resultados animadores em redução de morbimortalidade perinatal e materna com o emprego destas drogas (OLIVEIRA, 2010). A escolha no uso destas medicações reside no fato de não atravessarem a barreira útero-placentária (SARDINHA, 2006). Entretanto, não há consenso na utilização da dose profilática, sendo muito distinta a utilização na prática clínica do que é preconizado pela farmacologia, em especial da enoxaparina, que atualmente seria a principal droga de escolha pelas vantagens de apresentar menos efeitos colaterais, mais fácil administração (uso subcutâneo) e pouca flutuação de níveis plasmáticos que exigisse controle laboratorial quando comparada com a HNF. A literatura recomenda uma dose de 1mg/kg/dia como profilaxia máxima, mas na prática clínica diária emprega-se cerca de metade desta dose (ERKENS, 2010). Assim, neste trabalho optamos em usar a dose profilática máxima da enoxaparina no grupo experimental correspondente.

HNF, a primeira droga anticoagulante usada no período gestacional com segurança para o binômio materno-fetal tem documentadas algumas complicações como trombocitopenia, alopecia, hemorragias, osteopenia entre outros. Sua derivada de baixo

peso molecular, a enoxaparina está relacionada com menores taxas destas complicações (MAJERUS, 2003).

A escolha em se estudar especificamente o uso destas drogas, em especial a dose profilática máxima da enoxaparina deve-se ao fato de que a literatura é pobre nesta utilização, ainda mais em caráter experimental na gestação.

O foco das pesquisas tem sido principalmente na cicatrização óssea de modelos experimentais de fraturas e correções ortopédicas. Este foco deve-se justamente ao conhecimento de que as heparinas possuem um efeito sobre o metabolismo ósseo com relatos na literatura de osteopenia e justamente seus primeiros relatos aconteceram em gestantes, fato que foi associado a uso prolongado, uma vez que nas situações ortopédicas e fraturas o uso da heparina é por um período curto, indicados como profilaxia de tromboembolismo venoso na maioria das vezes e os trabalhos tem demonstrado que as doses profiláticas não interferiram a curto prazo nestes casos (CURCELLI, 2005), havendo ainda lacunas em modelo experimental de fratura com trombose venosa e uso de dose terapêutica em período maior. Contudo, na gestante, se for diagnosticada com um tromboembolismo logo no início ou antes da gestação o seu uso por nove meses ou mais acarreta um risco maior de osteopenia. Porém, ainda há situações conflitantes sobre a osteopenia fisiológica, própria da gestação, que poderia ser um fator de confusão. Por isso, no presente estudo, optamos pela análise comparativa com um controle não exposto ao anticoagulante.

O trabalho experimental realizado permitiu controlar o desenvolvimento da gestação com exposição às referidas drogas acompanhando o ganho ponderal, coleta de amostras de sangue para análise, observação de complicações e próximo ao término do período gestacional realizamos o estudo ecográfico fetal conforme padronizado para

estudo do desenvolvimento fetal e rastreamento de anormalidades (CHEEMA, 2012). Em seres humanos o estudo da dopplerfluxometria fetal se inicia entre o final do primeiro trimestre e início do segundo trimestre, contudo, em ratos fetais, pelo tamanho e dificuldade técnica, os estudos experimentais neste sentido têm dado preferência em se estudar a terceira semana gestacional mais próximo ao seu final, considerando que nestes animais a gestação tem duração de 21 dias.

Trabalhos experimentais com emprego do ultrassom são de extremo interesse para os profissionais que lidam com a saúde materno-infantil por ser extremamente disseminado na prática clínica e permitirem obter informações por meios menos invasivos e ter a vantagem de ser reprodutíveis, de baixo custo e praticamente inócuos.

A escolha de usar o fêmur para medir grau de osteopenia decorreu de ser um modelo já descrito em alguns trabalhos experimentais por sua facilidade anatômica em se extrair por acesso cirúrgico simples, além de ser um osso longo, sendo o maior do rato (KHAJURIA, 2015; MAHL, 2009). De fato, sua obtenção não representou obstáculos sendo uma dissecação relativamente simples de realizar. Optou-se por escolha aleatória por sorteio sobre qual fêmur seria extraído. Alguns trabalhos padronizaram a retirada fixa de um lado, como o fêmur direito, por provável conveniência, pois não encontramos justificativas para não se randomizar a lateralidade do espécime (PINTO, 2005).

Uma dificuldade apresentada na análise de osteopenia em modelo experimental com ratos é que os estudos publicados têm um pouco de limitação para uma análise mais completa e fidedigna em comparação com os humanos. Em seres humanos podemos avaliar a osteopenia principalmente por meio da densitometria óssea. Este recurso diagnóstico tem limite em uso experimental pois precisa de um banco de dados de determinado osso para se ter um padrão para que um programa de computador faça a

análise (PINTO, 2005). Pelo pequeno tamanho dos ossos destes animais falta aparelho adequado e estudos para se conseguir criar este padrão para avaliação. Neste sentido os modelos existentes usam medidas como peso do osso, comprimento, peso de cinzas, análise de área óssea por intermédio de programas de imagem para cálculo de área com parâmetro de imagem por radiografia e ou análise histológica, além de resistência a fratura por aparelhos calibrados para este fim (MAHL, 2009; PINTO, 2005).

A análise histomorfométrica do osso trabecular depende de programas de cálculo de área ou contagem de pontos em área selecionada e os utilizados no presente estudo foram bem práticos. Optou-se por usar estes dois modelos de análise histológica, um descrito por Pinto et al (2005) por percentual de área de secção com pontos de cruzamento de linhas traçadas num campo de imagem padronizado e outro modelo descrito por Mahl *et al.* (2009) que se recorta a área de osso trabecular e por função de histograma calcula-se a área. Assim, junto com medidas como peso e comprimento analisou-se se houve diferenças nestes dados entre os grupos, sendo observado que não houve diferença. O problema desta medida histológica é porque seu preparo envolve justamente descalcificação, porém, são os modelos existentes até que se desenvolva um melhor.

Com as metodologias escolhidas não encontrou-se o que se esperava, que poderia ser uma área menor nos grupos expostos aos anticoagulantes em dose terapêutica, embora o principal motivo possa ser o tempo de exposição, pois o trabalho pioneiro que demonstrou osteopenia em ratos expostos à HNF foi com administração do medicamento em dose terapêutica por 28 dias. Na literatura, estes modelos demonstraram perdas de osso trabecular na exposição de ratos com medicamentos da classe corticoesteróide (PINTO, 2005). Esses mesmos autores usaram a análise de marcadores bioquímicos

fosfatase alcalina, fosforo sérico, cálcio sérico, que pode servir de exemplo a se fazer em futuros trabalhos na mesma linha de pesquisa.

Escolheu-se avaliar peso do fêmur e seu comprimento como forma de estimar alterações de massa óssea e crescimento, conforme já utilizado em outros trabalhos (KAJHURIA, 2015).

Não houve diferença entre os pesos dos fêmures, sendo que caso houvesse osteopenia esperava-se encontrar pesos significativamente menores em relação ao controle. Não houve diferenças entre os comprimentos dos fêmures, que sugere não haver efeito sobre o crescimento ósseo.

Para realizar esta pesquisa escolheu-se o rato como animal de experimentação. Sua escolha foi favorecida por algumas características que lhe conferiram vantagem no seu uso como fonte rápida e farta na sua obtenção, facilidade de acondicionamento, boa aceitação da dieta, elevada resistência à infecção, virtuosa similaridade anatômica entre ratos e humanos, facilidade em procriação, fato que era importante para um modelo experimental de gestação. Além disso, a duração da prenhez de 21 dias, com cada semana gestacional correspondendo com o desenvolvimento humano trimestral da gravidez. Soma-se também o fato do rato ser amplamente estudado em diversas linhas de pesquisa experimental e muitos resultados obtidos em pesquisas com estes animais poderem ser extrapolados para os humanos. Outro fator que colaborou foi o fato de ter a disposição um laboratório equipado com todo material necessário para acomodação e realização da etapa experimental e uma fonte constante de criação de um biotério em proximidade ao laboratório.

Durante a realização do experimento não encontrou-se dificuldades na administrações de medicamentos, coleta de amostras de sangue para análise laboratorial e ao final o procedimento cirúrgico transcorreu também sem dificuldades tanto na laparotomia, onde se observava rapidamente os cornos uterinos e se procedia à sua dissecação de modo simples. Do mesmo modo a extração do fêmur. A administração de drogas no subcutâneo do dorso nugal dos ratos é simples, exige rápida contenção do animal e assim menos estresse para o mesmo. A coleta de amostra de sangue tem descrição por lancetação do canto medial de um olho, punção cardíaca, punção da veia caudal ou amputação de extremidade caudal. Optou-se pela punção da veia caudal por acreditarmos ser menos agressivo e possibilitar melhor controle de hemostasia, uma vez que o experimento envolvia drogas anticoagulantes e a hemostasia dos outros métodos seria mais difícil (PAIVA, 2005)

A qualidade do desenvolvimento materno e fetal foi observada com os ganhos ponderais constantes, sem diferenças entre os grupos com aumento significativo de peso até o final da prenhez colaborando para evidenciar que a exposição às drogas não interferiu de modo negativo nas gestações destes animais

Quanto ao desenvolvimento ponderal das ratas prenhes e das crias, com o uso de anticoagulantes não é comum alterações gastrointestinais que reduzam o hábito alimentar das ratas, por isso, a falta de diferenças de perdas/ ganhos ponderais era esperado, ao contrário do uso de medicações anti-retrovirais, que sabidamente provocam mal estar e modificam hábito alimentar ou alterações metabólicas hepáticas e pancreáticas e por isso se justifica encontrar perdas ponderais significativas como encontrado no trabalho de Figueiró-Filho (2002). Tanto a HNF quanto a enoxaparina não atravessam a barreira placentária (SARDINHA; SILVEIRA, 2006) e por isso já era esperado não ocorrer

diferenças entre o desenvolvimento ponderal dos fetos no presente trabalho, embora em situações de maior estresse pudessem ter ocorrido estas diferenças.

Foi interessante observar uma frequência maior de eventos hemorrágicos nos grupos expostos a doses terapêuticas de enoxaparina e HNF. A literatura aponta índices de sangramentos maiores na exposição à HNF (MAJERUS, 2003). Acreditamos que o fato pode ter ocorrido em virtude da administração subcutânea da HNF em dose terapêutica poder apresentar mais flutuação plasmática e seu controle ser mais difícil. Em humanos se preconiza o uso da HNF por via intravenosa com administração controlada com bomba de infusão contínua e controle rigoroso do TTPa. Uma dificuldade encontrada no trabalho foi a de não conseguir usar a forma de infusão contínua e a coleta do TTPa como era realizado pela manhã só conseguíamos fazer um ajuste na dose noturna e matutina do dia seguinte. O ideal seria um aparelho mais próximo ao laboratório e também mais coletas para diminuir o tempo de resposta com o resultado deste exame. Desta forma é provável que não tenhamos atingido um nível plasmático anticoagulante estável da HNF em dose terapêutica e isso pode explicar o fato de termos observado eventos hemorrágicos no grupo da enoxaparina dose terapêutica, quando esperávamos que fosse mais frequente apenas no grupo HNF dose terapêutica.

No tocante ao aparelho de ultrassom, optou-se por um aparelho robusto, fixo, mais difícil de deslocar, porém, com a vantagem de programas mais calibrados e melhores em quase todos os aspectos técnicos de software de processamento de imagens e cálculos em relação a um aparelho portátil. O aparelho portátil é mais prático pelo tamanho, possibilidade de deslocamento, porém, tem recursos de tecnologia limitados em comparação a um aparelho fixo. No presente trabalho utilizou-se um aparelho fixo, de clínica particular cedido ao laboratório de técnica cirúrgica no período em que se realizou

a etapa experimental. Os estudos experimentais disponíveis utilizaram também aparelhos fixos. A tendência, porém, é que os aparelhos se miniaturizem mantendo a qualidade dos recursos tecnológicos de processamento de imagem e dados. Atualmente estão surgindo os transdutores com conexão sem fio (*wireless*) e aparelhos do tamanho de telefones celulares ou mesmo com sistemas que comunicam por internet os programas de processamento mais pesado ocupando menos memória e retransmitindo a formação da imagem e cálculos para o celular. Outro recurso em pleno desenvolvimento é o emprego de meios de contraste para ultrassom e reconstruções de imagem tridimensional que em breve estarão sendo realizados em pesquisas experimentais (ZHOU, 2013).

A presença de pêlos em alguns animais foi motivo de dificuldade em se obter uma boa interface da pele com o transdutor, sendo necessário aplicar uma boa quantidade de gel para ultrassom. A obtenção de imagem transcorreu sem dificuldades, o fato do animal estar anestesiado favoreceu a pesquisa tranquila e execução do exame, porém, podemos ter influência também da anestesia sobre a hemodinâmica geral e consequente interpretação dos dados. Por outro lado, faltam estudos na literatura sobre estudo ecográfico com os animais não anestesiados e se fosse assim realizado também o estresse da contenção poderia interferir. Assim, optou-se em seguir a maioria dos modelos já utilizados com anestesia para proceder ao exame do ultrassom sob anestesia (STASINOPOULOU, 2014; HERNANDEZ-ANDRADE, 2014; PAIVA, 2005).

Outro ponto a ser destacado no presente estudo é no tocante a escolha em três fetos de cada corno uterino. Na literatura os trabalhos (STASINOPOULOU, 2014; HERNANDEZ-ANDRADE, 2014) analisavam de um a dois fetos em sua maioria e não apresentavam um padrão por corno uterino, sendo apenas os fetos mais visíveis, mais superficiais e de maior tamanho. Optou-se pelo primeiro e último feto de cada corno até

para correlacionar diferenças entre os mais proximais e distais na irrigação uteroplacentária. Um feto intermediário foi escolhido aleatoriamente após mapear a quantidade de fetos naquele segmento para não correr no viés de escolha no feto aparentemente mais fácil.

Por padronização internacional os vasos mais estudados no exame ultrassonográfico fetal são a artéria cerebral média, o ducto venoso, artéria umbilical e as artérias uterinas (KALACHE, 2012). A hemodinâmica anormal pode inferir alterações no desenvolvimento fetal e saúde de uma boa implantação placentária (KALACHE, 2012; CHEEMA, 2012; MAIZ, 2009).

Um fator que merece destaque foi que apesar de literatura recomendar frequências maiores para estudo ultrassonográfico de estruturas mais superficiais (SALLES-CUNHA, 2016), em torno de 15Hz. Trabalhou-se com um aparelho cuja sonda linear apresentava faixa de frequência entre 4,8Hz e 11Hz e os exames foram obtidos com faixa de frequência entre 7,2Hz e 10,2 Hz sem maiores dificuldades, contando com a experiência do examinador principal, com formação em ultrassonografia fetal de cerca de quinze anos e o examinador assistente com formação em ultrassonografia vascular com Doppler com três anos de experiência à época do presente estudo.

A escolha em se pesquisar o fluxo Doppler dos vasos materno fetais após a exposição das ratas gestantes às drogas anticoagulantes justifica-se por estes vasos estarem padronizados para vigilância do desenvolvimento e saúde fetal, ou também vigilância multivascular, fundamental em gestações de alto risco (CHEEMA, 2012). A análise do Doppler das artérias umbilical e uterina avaliam a saúde fetal e o risco materno de pré-eclâmpsia (KALACHE, 2012).

A velocimetria na artéria cerebral média fetal pode produzir evidências da presença de anemia e em casos de restrição do crescimento intrauterino (RCIU) o risco de lesões hipóxicas. As formas de onda de Ducto venoso auxiliam a prever o risco fetal e devem ser usadas quando as formas de onda da artéria umbilical tornam-se anormais. O Doppler da artéria uterina no início da gestação demonstra o estado da vasculatura placentária sendo excelente ferramenta para prever o risco de pré-eclâmpsia ou RCIU (KALACHE, 2012; CHEEMA, 2012).

A avaliação dopplerfluxométrica das artérias cerebrais médias (ACM) mede indiretamente o grau de oxigenação do cérebro fetal, pois em fetos com boa oxigenação os valores de IR e IP da ACM são altos (KALACHE, 2012; CHEEMA, 2012). No presente estudo não se evidenciou diferenças entre as medidas de VPS, IR e IP das ACM entre os grupos expostos as heparinas e o controle, bem como entre si, o que se relaciona que não houve interferência na hemodinâmica e diferenças de oxigenação fetal na exposição às heparinas.

O ducto venoso (DV), cujo gradiente de pressão venosa central é medido indiretamente é um ramo da artéria umbilical que leva sangue oxigenado sob pressão para o átrio esquerdo passando pelo átrio direito e forame oval. Na morfologia da onda do ducto venoso são observadas as ondas S (sístole ventricular), D (diástole ventricular) e A (sístole atrial) sendo todas positivas. Em situação de hipóxia com aumento da pré carga cardíaca o DV apresenta aumento de seu índice de pulsatilidade venoso (IP). Caso a hipóxia seja grave com comprometimento miocárdico, a onda A tende a desaparecer ou ser reversa (o sangue retorna ao DV) (KALACHE, 2012; ROYSTON, 1998). No presente trabalho não foram observadas alterações de morfologia de onda e a comparação dos

índices de VPS, IP e IR não foram de diferença estatística significativa em relação dos grupos expostos às heparinas e o controle e entre si.

O estudo das artérias umbilicais indica funcionamento placentário inadequado especialmente quando ocorre aumento do IR ou IP (CHEEMA, 2012; ROYSTON, 1998). Na presente amostra, não se obteve diferenças significativas destes índices entre os grupos.

Após avaliação destes vasos a análise do fluxo das artérias uterinas permite conhecer o estado da implantação placentária (KALACHE, 2012). Em fluxo considerado normal de artérias uterinas decorrente de implantação placentária e invasão do trofoblasto adequados, quando o IR ou IP estão elevados para a idade gestacional, há aumento de risco para CIUR (crescimento intrauterino restrito) e pré-eclâmpsia em decorrência de placentação inadequada. Melhor adesão placentária/ invasão trofoblástica foram observadas em ratas expostas a HBPM (ZHANG, 2012; ERDEN, 2006), portanto, esperava-se que não houvesse alterações na análise dopplerfluxométrica das artérias uterinas. De fato, na presente amostra não se demonstrou diferenças significativas dos índices dopplerfluxométricos entre os grupos.

Em casos de má formação cerebral ou hipóxia há grandes chances de mudanças no padrão de fluxo na artéria cerebral média (CHEEMA, 2012). Deste modo, a avaliação deste parâmetro é ferramenta na pesquisa de teratogenicidade e desenvolvimento cerebral em experimentação com drogas em relação a um controle. Medicamentos que atuem negativamente na placentação podem ter seus efeitos mensurados pelo estudo do fluxo na artéria uterina. As heparinas em estudos experimentais demonstraram aumentar e melhorar a invasão trofoblástica, efeito benéfico que corrobora seu emprego em gestantes trombofílicas até mesmo profilaticamente para prevenir trombose placentária ou má

placentação e consequente perda fetal ou abortamento (ZHANG, 2012). Deste modo alterações nos padrões de dopplerfluxometria das artérias uterinas e dos vasos umbilicais não eram esperadas, como foi observado no presente trabalho, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Foi interessante confirmar que não houve diferenças estatísticas nos índices de dopplerfluxometria nos vasos estudados, em especial a artéria umbilical, frente que a sua análise reflete uma boa saúde uteroplacentária e estudos experimentais demonstraram em ratas que a exposição à enoxaparina aumenta a adesão e invasão trofoblástica com aumento de proteínas de adesão como a E-caderina e, portanto, esperava-se que não houvesse alterações em relação ao controle (ERDEN, 2006; ZHANG, 2012). De modo geral a confirmação de não interferência foi possível pelo fato de não ter se observado alterações nos índices de velocidade estudados. Caso houvessem alterações, pesquisaríamos se houve alguma má formação ou outro achado negativo do desenvolvimento fetal.

As drogas empregadas parecem interferir nos processos bioquímicos de implantação e manutenção do embrião de modo positivo, pois várias pesquisas sobre os efeitos das heparinas na invasão e modulação trofoblástica e mecanismos anti-apoptóticos dos tecidos placentários e deciduais demonstram benefício no uso destas medicações (ERDEN, 2006; ZHANG, 2012). Mais uma justificativa para que os resultados do presente estudo não tenham demonstrado diferenças entre os índices dopplervelocimétricos das artérias uterinas e umbilicais.

No presente estudo sobre a exposição dos anticoagulantes na prenhez e se houve alterações na dopplerfluxometria fetal em ratas não se observou alterações de morfologia

de onda nem mesmo diferenças significativas entre os grupos quanto aos índices velocimétricos nos diferentes vasos estudados.

A extrapolação direta dos resultados obtidos neste estudo para os seres humanos deve ser cautelosa em toda pesquisa experimental. Não é diferente esta observação para o presente trabalho, mas de um modo geral, no tocante as alterações hemodinâmicas e conseqüentemente nos índices dopplerfluxométricos que poderiam ser provocados pela exposição das ratas prenhes à enoxaparina e HNF, pode-se inferir que não modificam esta dinâmica de fluxo. Assim, faz com que os dados obtidos possam ser incorporados na literatura sobre este assunto.

Em relação ao peso de fetos, número de fetos e pesos placentários não se observou diferenças entre os grupos, conforme o esperado, uma vez que as drogas do experimento não tiveram associação com alterações de taxas de fertilidade (FIGUEIRO-FILHO, 2012) e efeitos positivos de desenvolvimento e fixação placentária observado em alguns estudos como o de Erden *et al.* (2006).

Na presente amostra o tempo médio de exame efetivo ultrapassou os 20 minutos em todas as ratas, porém, não foi objetivo avaliar o aspecto de efeitos do tempo de exposição, mas deve-se ter cautela com este tempo de aplicação do ultrassom sobre os possíveis efeitos deletérios fetais que podem ser provocados especialmente em ratos conforme já demonstrado em alguns estudos (LI, 2014). O tempo de exposição dos fetos nesse estudo foi superior ao de Li *et al.* (2014) e analisou-se o peso fetal e placentário de todas as crias após laparotomia e não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

O presente trabalho fornece subsídios para se confirmar que a aplicação do ultrassom em prenhez experimental é factível e seguro ao avaliar efeitos de drogas sobre a hemodinâmica fetal. Também permite servir de base para novos estudos com modelos patológicos (pré-eclampsia, trombose venosa, etc). Outra situação importante a ser analisada em trabalhos nesta mesma linha seria a análise placentária, que com um planejamento mais adequado pode fornecer informações úteis acerca da saúde deste órgão em pesquisas vindouras, especialmente se usar modelos patológicos experimentais como de pré-eclampsia e trombose venosa profunda.

8 CONCLUSÕES

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

Em relação a prenhez em geral:

- Não houve alterações significativas no desenvolvimento da gestação experimental.

Em relação ao desenvolvimento ponderal:

- Ocorreu adequado ganho de peso desde o início da prenhez, com aumentos significativos entre 7 e 14 dias, 7 e 20 dias e entre 14 e 20 dias.
- Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos tratamento e o grupo controle em cada período estudado (7, 14 e 20 dias).

Em relação ao desenvolvimento peri-natal das crias:

- Não houve redução do peso dos fetos entre os grupos.
- Não houve redução do número de fetos por ninhada entre as ratas *Wistar*.
- Não houve diferenças dos pesos placentários entre os fetos.

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

- Houve um número maior de ratas que apresentaram pelo menos um evento hemorrágico ao final dos 20 dias de prenhez nos grupos expostos à Enoxaparina e Heparina não fracionada em doses terapêuticas.

Em relação dopplerfluxometria dos vasos fetais e das artérias uterinas:

- Não houve diferenças estatísticas nas VPS, IP, IR e formato de onda espectral nos vasos estudados entre os grupos com o grupo controle e os grupos entre si.

Em relação aos efeitos sobre o fêmur:

- Não houve diferenças entre os pesos secos dos fêmures.
- Não houve diferenças entre os pesos dos fêmures após descongelamento.
- Não houve diferenças entre os comprimentos dos fêmures.
- Não houve diferenças das porcentagens de área trabecular óssea dos fêmures analisados microscopicamente.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA SA *et al.* **Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress.** Braz J Med Biol Res. 33:1105-9, 2000.

BATES SM *et al.* **Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy.** American College of Chest Physicians Evidence-Based clinical practice guidelines (8th edition) CHEST. 141 (2) (Supl):e691S-e736S, 2012.

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

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

CHEEMA R *et al.* **Multivascular Doppler surveillance in high risk pregnancies.** J Matern Fetal Neonatal Med. 25(7):970-4, Jul, 2012.

CURCELLI E *et al.* **Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura da tíbia no rato: avaliação clínica e anatomopatológica e biomecânica.** Acta Ortop Bras. 13(1): 13-16, 2005.

DANIEL NN, KORSMEYER SJ. **Cell death: critical control points.** Cell. 116:205-19, 2004.

DEGANI S *et al.* **Early second-trimester low umbilical coiling index predicts small-for-gestational-age fetuses.** J Ultrasound Med. 20(11):1183-8, Nov, 2001.

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

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

DIMITRAKAKIS C *et al.* **Absence of transplacental passage of the low molecular weight heparin enoxaparin.** Haemostasis. 30(5):243–8, 2000.

DUCK FA. **Hazards, risks and safety of diagnostic ultrasound.** Med Eng Phys. 30: 1338–1348, 2008.

ERDEN O *et al.* **Investigation of the effects of heparin and low molecular weight heparin on E-cadherin and laminin expression in rat pregnancy by immunohistochemistry.** Hum Reprod. 21(11): 3014-8, Nov, 2006.

ERKENS PM, PRINS MH. **Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism.** Cochrane Database Syst Rev. 8(9) Sep, 2010.

EKIN A *et al.* **Effect of antenatal betamethasone administration on Doppler velocimetry of fetal and uteroplacental Vessels: a prospective study.** J Perinat Med. 44(2):243-8, mar, 2016.

FIGUEIRÓ-FILHO EA *et al.* **Efeito das drogas anti-retrovirais sobre as taxas de fertilidade de ratas Wistar.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 24(10): 647-652, 2002.

FIGUEIRÓ-FILHO EA, OLIVEIRA VM. **Associação entre abortamentos recorrentes, perdas fetais, pré-eclâmpsia grave e trombofilias hereditárias e**

anticorpos antifosfolípidos em mulheres do Brasil Central. Rev Bras Ginecol Obstet. 29(11):561-7, 2007.

FIGUEIRÓ-FILHO EA *et al.* **Marcadores séricos de trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em gestantes com antecedentes de pré-eclâmpsia grave.** Rev Bras Ginecol Obstet. 34(1):40-6, 2012.

GALAN HL *et al.* **Comparison of low- and high-altitude Doppler velocimetry in the peripheral and central circulations of normal fetuses.** Am J Obstet Gynecol. 183(5):1158-61, Nov, 2000.

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

HAYASHI M *et al.* **The levels of Five markes of hemostasis and endothelial status at differrent stages of normotensive pregnancy.** Acta Obstet Gynecol Scand. 81(3):208-13, 2002.

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

HERNANDEZ-ANDRADE E *et al.* **Evaluation of utero-placental and fetal hemodynamic parameters throughout gestation in pregnant mice using high-frequency ultrasound.** Ultrasound Med Biol. 40(2):351-60, Feb, 2014.

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

HIRSH J. **Heparin.** N Engl J Med. 324: 1565-74, 1991b.

KALACHE KD, DÜCKELMANN AM. **Doppler in obstetrics: beyond the umbilical artery.** Clin Obstet Gynecol. 55(1):288-95, Mar, 2012.

KEARON C *et al.* **Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report.** Chest. 149(2): 315-352, 2016.

KEMKES-MATTHES J. **Changes in the blood coagulation system in pregnancy.** Z Kardiol. 90(4):45–8, 2001.

KHAJURIA DK *et al.* **Efeitos da terapia combinada com ácido zoledrônico e propranolol na resistência mecânica em um modelo de rato com osteoporose por desuso.** Rev Brasileira de Reumatologia. 55(6): 501-11, 2015.

KISERUD T, CHEDID G. **Foramen ovale changes in growth-restricted fetuses.** Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 24 (2): 141-146, 2004.

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

LI P *et al.* **Prenatal exposure to ultrasound affects learning and memory in young rats.** Ultrasound Med Biol. 41(3):644-53, Mar, 2015.

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

MAHL CRW *et al.* **Avaliação radiográfica e histomorfométrica da mandíbula de ratas medicadas com glicocorticoide e bifosfonato.** Revista Fac Odontol Porto Alegre. 50 (1):16-19, 2009.

MAIZ N *et al.* **Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation.** Ultrasound Obstet Gynecol. 33: 512–517, 2009.

MAJERUS PW, TOLLEFSEN DM. **Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários.** In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill. 1141-55, 2013.

MILLER DL, THOMAS RM. **Heating as a mechanism for ultrasonically-induced petechial hemorrhage in mouse intestine.** *Ultrasound Med Biol.* 20: 493–503, 1994.

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

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

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

PAIVA FP *et al.* **Apostila do Curso de manipulação de animais de laboratório.** Salvador: Ministério da Saúde- FIOCRUZ. 13-22, 2005. Disponível em URL: <www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf>.

PELLERITO J, POLAC JF. **Introduction to vascular ultrasonography.** 6th edition. Saunders. p. 9-23, 2012.

PELLICER B *et al.* **Ultrasound bioeffects in rats: quantification of cellular damage in the fetal liver after pulsed Doppler imaging.** *Ultrasound Obstet Gynecol* 37: 643–648, 2011.

PEREIRA MG. **Anticoagulantes, antiagregantes plaquetários e trombolíticos.** In: Silva P. *Farmacologia.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 604-13, 2002.

PIERCY CN *et al.* **Low-molecular-weight heparin for obstetric thromboprophylaxis: Experience of sixty-nine pregnancies in sixty-one women at high risk.** *Am J Obstet Gynecol.* 176:1062-8, 1997.

PINTO AS *et al.* **Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona sobre a osteoporose induzida com dexametasona em ratas.** Rev. Ciênc. Farm. Básica 26(1). 63-70, 2005.

ROBIN F *et al.* **Anticoagulant therapy in pregnancy.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 83(2): 171–177, 1999.

ROYSTON P, WRIGHT EM. **How to construct ‘normal ranges’ for fetal variables.** Ultrasound Obstet Gynecol. 11:30–8, 1998.

SALLES-CUNHA SX, DE MORAIS FILHO D. **Princípios básicos.** In: Engelhorn CA, de Moraes Filho D, Barros FS, Coelho NA. Guia prático de ultrassonografia vascular. Rio de Janeiro: Editora Dilivros. p. 1-15, 2007.

SALLES-CUNHA SX, DE MORAIS FILHO D. **Princípios básicos de ultrassonografia vascular.** In: Engelhorn CA, de Moraes Filho D, Barros FS, Coelho NA. Guia prático de ultrassonografia vascular. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Dilivros. 2016.

SANSON BJ *et al.* **Safety of low-molecularweight heparin in pregnancy: a systematic review.** Thromb Haemost. 81(5):668–72, 1999.

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

SHAUGHNESSY S *et al.* **A Histomorphometric Evaluation of Heparin-Induced Bone Loss After Discontinuation of Heparin Treatment in Rats.** Blood. 93: 1231-1236, 1999.

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

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

SILVEIRA PRM. **Trombose venosa profunda e gestação: aspectos etiopatogênicos e terapêuticos**. *J Vasc Bras*. 1(1):65-70, 2012.

SINARD JM *et al*. **Heparin Reduces Neuroinflammation and Transsynaptic Neuronal Apoptosis in a Model of Subarachnoid Hemorrhage**. *Transl. Stroke Res*. 3 (Suppl 1):S155–S165, 2012.

SPENCER R *et al*. **EVERREST Consortium. EVERREST prospective study: a 6-year prospective study to define the clinical and biological characteristics of pregnancies affected by severe early onset fetal growth restriction**. *BMC Pregnancy Childbirth*. 17(1):43, Jan, 2017.

STASINOPOULOU M *et al*. **Use of real-time ultrasonography as an alternative method for early detection, confirmation and evaluation of rat pregnancy**. *Ultrasound Med Biol*. 40(6):1372-8, Jun., 2014.

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

UCHIKOVA EH, LEDJEV II. **Changes in haemostasis during normal pregnancy**. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 119:185–188, 2005.

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

WARKENTIN TE *et al*. **Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin**. *N Engl J Med*. 332(20):1330–5, 1995.

WISE PH, HALL AJ. **Heparin-induced osteopenia in pregnancy.** British Medical Journal. 110-11, 1980.

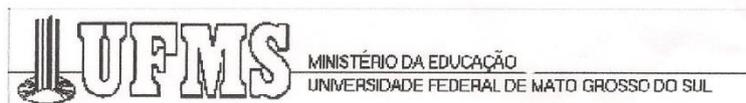
YANG FY *et al.* **Prenatal exposure to diagnostic ultrasound impacts blood-brain barrier permeability in rats.** Ultrasound Med Biol. Jun; 38(6):1051-7, 2012.

YAMAMOTO Y *et al.* **Doppler parameters of fetal lung hypoplasia and impact of sildenafil.** Am J Obstet Gynecol. 211(3):263.e1-8, Sep., 2014.

YU TG *et al.* **Protective effect of ultra low molecular weight heparin on glutamate-induced apoptosis in cortical cells.** Yonsei Med J. 49(3): 486-95, 2008.

ZHANG Y *et al.* **Low molecular weight heparin inhibits cell apoptosis in the placenta of rats with preeclampsia-like symptoms.** Nan Fanq Yi Ke Da Xue Xue Bao. 32(6): 862-6, Jun., 2012.

ZHOU YJ *et al.* **Real-time placental perfusion on contrast-enhanced ultrasound and parametric imaging analysis in rats at different gestation time and different portions of placenta.** PLoS One. 8(4):e58986, 2013.

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

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

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


Dr^a Joice Stein
Presidente da CEUA

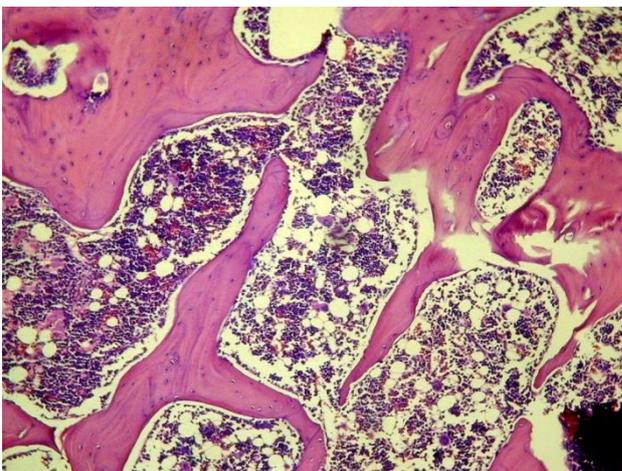
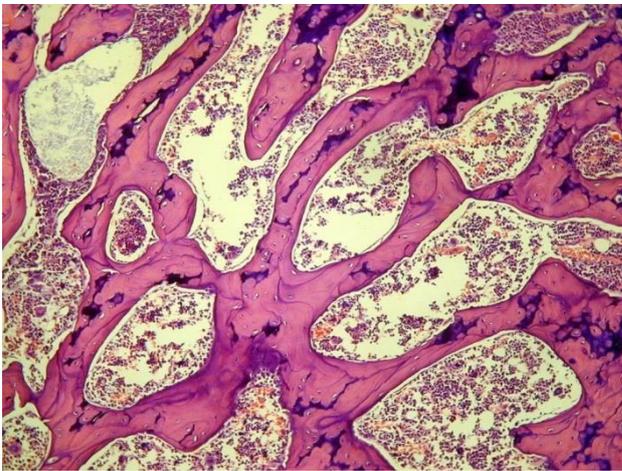
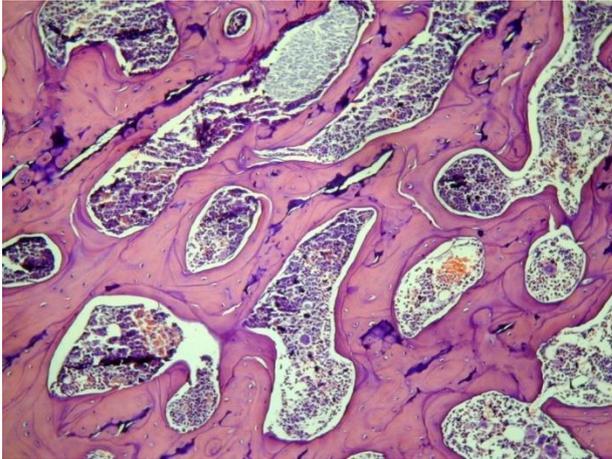
ANEXO B- Tabela de ajuste de dose do grupo V.

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

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

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

ANEXO C- Alguns exemplos de lâminas de osso trabecular da presente pesquisa



ANEXO D- CARTA DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO ACTA CIRÚRGICA

Acta Cirúrgica Brasileira - Decision on Manuscript ID ACB-2017-0062

24-Apr-2017

**ACTA
CIRÚRGICA
BRASILEIRA**

Dear Dr. Senefonte:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "DOPPLER VELOCIMETRY IN FETAL RATS EXPOSED TO ENOXAPARIN AND UNFRACTIONATED HEPARIN (UFH) DURING PREGNANCY" in its current form for publication in the Acta Cirúrgica Brasileira.

Our publishing team will contact you for further details before final publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Acta Cirúrgica Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Edna Montero
Editor-in-Chief, Acta Cirúrgica Brasileira
actacirbras@gmail.com

DOPPLER VELOCIMETRY IN FETAL RATS EXPOSED TO ENOXAPARIN AND UNFRACTIONATED HEPARIN (UFH) DURING PREGNANCY

Journal:	Acta Cirúrgica Brasileira
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Senefonte, Flavio; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Faculdade de Medicina, Saude e desenvolvimento Aydos, Ricardo; Federal University of Mato Grosso do Sul, Surgery Oliveira, Vanessa; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS Bosio, Marco; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Faculdade de Medicina, Surgery Figueiró-Filho, Ernesto; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Surgery
Keyword - Go to DeCS or MeSH to find your keywords.:	anticoagulant drugs, Doppler, rats, ductus venosus, uterine artery

SCHOLARONE™
Manuscript

DOPPLER VELOCIMETRY IN FETAL RATS EXPOSED TO ENOXAPARIN AND UNFRACTIONATED HEPARIN (UFH) DURING PREGNANCY

Flavio Renato de Almeida Senefonte^I, Ricardo Dutra Aydos^{II}, Vanessa Marcon de Oliveira^{III}, Marco Antonio Costa Bósio^{IV}, Ernesto Antonio Figueiró-Filho^V

^I Fellow PhD degree, Post-graduate Program in Health and Development, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study, technical procedures, data acquisition and interpretation, statistical analysis, manuscript writing, critical revision.

^{II} PhD, Associate Professor, Department of Surgery, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, critical revision, final approval.

^{III} PhD, Pharmacist, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil. Technical procedures, data acquisition and interpretation.

^{IV} MD, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil. Technical procedures, data acquisition and interpretation.

^V PhD, Associate Professor, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study, supervision of all phases of the investigation, critical revision, final approval.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effects of enoxaparin and unfractionated heparin (UFH) administered in prophylactic and therapeutic doses on fetal vessels in healthy pregnant Wistar rats, according to Doppler velocimetry measurements. **Methods:** Fifty animals were assigned to one of five groups: controls (saline), prophylactic and therapeutic enoxaparin (1 and 2 mg/kg/day, respectively), and prophylactic and therapeutic UFH (72 and 400 UI/kg/day, respectively). Uterine horns were examined by ultrasound for identification of live fetuses. A sample of these fetuses underwent Doppler velocimetry. Spectral curves, peak systolic velocity (PSV), pulsatility index (PI), and resistance index (RI) of the middle cerebral artery, ductus venosus, and umbilical artery were investigated. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. **Results:** No significant differences in PSV, PI, or RI values were observed among the groups. **Conclusion:** Doppler velocimetry measurements revealed no significant effects of enoxaparin or UFH on fetal vessels in pregnant Wistar rats.

Keywords: ultrasonography, Doppler, rats, fetal, prenatal, ductus venosus, middle cerebral artery, uterine artery, heparin, anticoagulant drugs, pulsatility index, resistance index.

Introduction

Thromboembolic events are the principal cause of maternal mortality. Administration of anticoagulants during pregnancy, particularly at prophylactic doses in patients with previous miscarriage or fetal loss, proven thrombophilia, or a history of venous thromboembolism, has increased over the past decades. Risks, however, cannot be ruled out, and most side effects of anticoagulant administration have been documented. Heparins are recognized as the safest anticoagulant agents.¹⁻⁵

Experimental studies of heparin administration during pregnancy have revealed improved uteroplacental modulation, invasion, and adhesion, with lower rates of fetal loss, miscarriage, and pre-eclampsia.⁶⁻⁷

Ultrasonography is an important routine prenatal examination, providing morphological and physiological investigation, particularly with the echo-Doppler technique. Doppler velocimetry (also known as Doppler flowmetry) of fetal circulation is a highly useful tool for screening, as well as for probing for pre-eclampsia predictors, intrauterine growth restriction, fetal distress, and the likelihood of genetic abnormalities such as aneuploidy.²

Given the widespread use of ultrasonography in the first trimester of pregnancy, fetal exposure to Doppler has been increasingly investigated for its safety and bioeffects.³⁻⁵ Good placental formation and fetal oxygenation can be predicted using Doppler velocimetry to evaluate resistance and pulsatility indices and spectral waveforms of uterine arteries, umbilical arteries, ductus venosus, and the middle cerebral artery.^{2,8,9}

The purpose of the present study was to evaluate patterns observed in pulsed Doppler velocimetry after exposure to unfractionated heparin (UFH) and low-molecular-weight heparin in pregnant Wistar rats.

Methods

This experimental study, conducted at the Laboratory of Surgical Techniques of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil, included 50 female adult Wistar rats weighing 160-300 g. On day 0 of pregnancy, the animals were randomly assigned to one of five groups to receive the following subcutaneous treatments: saline (group I, controls), prophylactic enoxaparin at 1 mg/kg/day (group II), therapeutic enoxaparin at 2 mg/kg/day (group III), prophylactic UFH at 72 IU/kg/day (group IV), or therapeutic UFH at 400 IU/kg/day (group V).

The animals were housed in cages at suitable temperature and humidity. The shelves were kept under a natural light–dark cycle and brightness was controlled in the facility. Food and water were provided *ad libitum* before and throughout the pregnancy period.

Once housed with males, the females were considered pregnant (day 0 of pregnancy) when sperm was found in vaginal smears, which were taken daily.

Fetal ultrasonography was performed on day 18 of pregnancy. To this end, the females were intraperitoneally anesthetized with xylazine (5-10 mg/kg) and ketamine (50-75 mg/kg) and had their abdomens shaved.

Ultrasonography

Ultrasound examination employed a Toshiba SSA-660A Xario device equipped with a 4.8-11 MHz multifrequency linear probe. An axial section at the top of the maternal pelvis was initially examined, and the probe was then moved cranially toward the bladder

until the uterine horns and fetuses were located and identified. Fetal viability was confirmed. The first and last fetuses in each uterine horn, in addition to a randomly chosen intermediate fetus, were selected for examination (Figure 1). In each fetus, a sagittal view was used to identify the middle cerebral artery, ductus venosus, and umbilical artery by analyzing a sample volume in color mode and spectral mode, followed by pulsed Doppler.

Continuous, pulsed, color, and Power Doppler modes were employed. All examinations were conducted by the same observers.

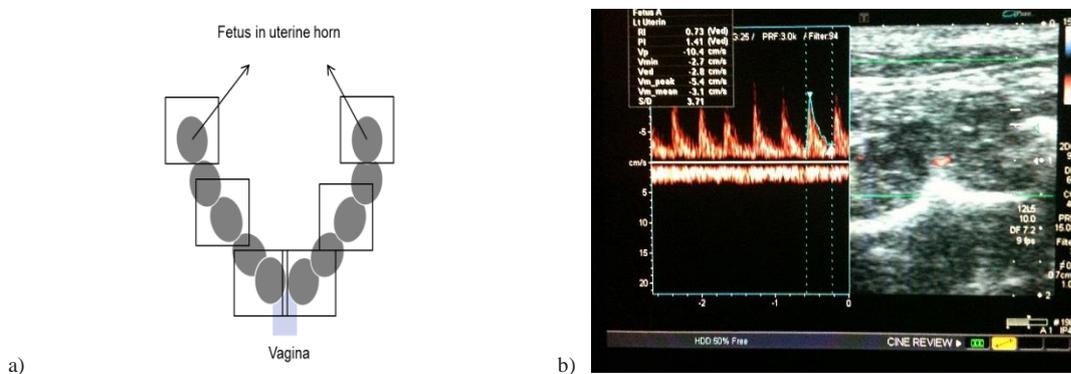


Figure 1. (a) Study design: Fetus sampling in uterine horns. The first, the last, and an intermediate fetus were selected in each uterine horn. (b) Example of pulsed Doppler uterine artery waveform.

Pulsed Doppler exposure was performed at a frequency of 7.2-10.2 MHz and a frame rate of 19.5. Two-dimensional gain was set at 90%, color gain at 40%, and PRF between 10 and 15 cm/s. Sample volume was 0.5 mm. The insonation angle was kept at $<30^\circ$.

The middle cerebral artery, ductus venosus, and umbilical artery were recognized based on blood flow waveforms of the sample, detected in color mode for brain, liver, and ventral scans. After vessel identification, speed curve measurements—peak systolic velocity (PSV), pulsatility index (PI), and resistance index (RI)—were automatically obtained.

On day 20 of pregnancy, the animals were submitted to euthanasia (toxic anesthetic dose), followed by median laparotomy and fetal and placental removal. Maternal weight was measured and the fetuses counted and individually weighed (Figures 2 and 3).



Figure 2. Uterine horns, with fetuses and placentas, on day 20 of pregnancy.

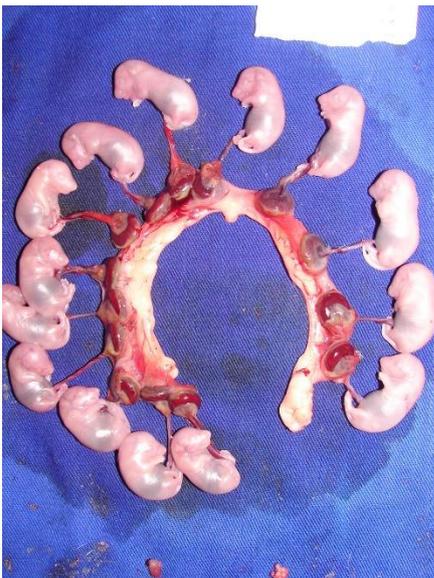


Figure 3. Open uterine horns, showing fetuses, placentas, and implantation sites on day 20 of pregnancy.

Statistical analysis

Quantitative data were examined for normality using the Shapiro–Wilk test. Data exhibiting normal distribution were expressed as means \pm standard deviations, and otherwise as medians \pm interquartile differences.

Weight of pregnant animals, number of fetuses, and PSV, PI, and RI values were subjected to Student's *t*-test for comparisons between groups. For data with normal distribution and similar variances, ANOVA was employed to compare three or more groups for the same variables.

The Mann–Whitney test was used to compare medians between two independent samples, and Kruskal–Wallis to compare medians among three or more independent samples, with Dunn's post-test performed when *p*-values proved significant.

Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

GraphPad Prism software, version 3.00, was used for all statistical calculations.

Ethics

Guidelines for care and use of laboratory animals were fully complied with. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (permit 282, issued March 11, 2011).

RESULTS

No technical difficulties occurred during vessel insonation. The acoustic window was adequate, with excellent bilateral visualization of vessels in 100% of cases. Mean time of examination was 37.3 ± 12.1 minutes per pregnant rat, with no significant differences among the groups.

No curves with zero or reverse diastoles were observed. Comparisons between experimental groups and control group, as well as across groups, revealed no significant differences in the mean numbers of fetuses per female, per uterine horn, or between left and right uterine horns (Table 1).

Table 1. Fetuses per female and per uterine horn on day 21 of gestation.

Group	Fetuses per female (mean \pm 1 SD)	Fetuses per right uterine horn (mean \pm 1 SD)	Fetuses per left uterine horn (mean \pm 1 SD)	<i>p</i> *
I: Control	12.82 \pm 2.34	6.32 \pm 0.24	6.18 \pm 0.37	–
II: Enoxaparin, prophylactic dose	11.98 \pm 1.78	6.05 \pm 0.41	5.98 \pm 0.23	<i>ns</i>
III: Enoxaparin, therapeutic dose	12.23 \pm 1.94	6.17 \pm 0.35	6.21 \pm 0.25	<i>ns</i>
IV: UFH, prophylactic dose	12.57 \pm 2.03	6.12 \pm 0.17	6.14 \pm 0.34	<i>ns</i>
V: UFH, therapeutic dose	12.34 \pm 1.56	6.25 \pm 0.14	6.08 \pm 0.18	<i>ns</i>

**p* < 0.05 (Student's *t*-test, experimental groups vs. control group; ANOVA, intergroup comparisons). *ns*: non-significant; SD: standard deviation.

No significant differences were observed across groups in mean maternal weight gains from the beginning to the end of gestation. No significant differences were detected in fetal or placental mean weights (Table 2).

Table 2. Maternal, fetal, and placental weight gains, as measured on day 21 of gestation.

Group	Maternal weight gain (g; mean \pm 1 SD)	<i>p</i> *	Fetal weight (g; mean \pm 1 SD)	<i>p</i> *	Placental weight (g; mean \pm 1 SD)	<i>p</i> *
I: Control	8.22 \pm 1.32	–	5.62 \pm 0.78	–	0.83 \pm 0.18	–
II: Enoxaparin, prophylactic dose	8.19 \pm 1.08	<i>ns</i>	6.01 \pm 0.24	<i>ns</i>	0.81 \pm 0.15	<i>ns</i>
III: Enoxaparin, therapeutic dose	7.92 \pm 1.51	<i>ns</i>	5.83 \pm 0.62	<i>ns</i>	0.83 \pm 0.22	<i>ns</i>
IV: UFH, prophylactic dose	8.27 \pm 1.25	<i>ns</i>	5.67 \pm 0.55	<i>ns</i>	0.84 \pm 0.17	<i>ns</i>
V: UFH, therapeutic dose	7.94 \pm 1.42	<i>ns</i>	5.72 \pm 0.81	<i>ns</i>	0.82 \pm 0.23	<i>ns</i>

**p* < 0.05 (Student's *t*-test, experimental groups vs. control; ANOVA, intergroup comparisons). *ns*: non-significant; SD: standard deviation.

PSV, RI, and PI did not show normal distribution on the Shapiro–Wilk test and are expressed as expressed in medians and interquartile differences in Tables 3 and 4.

Comparisons of PSV, RI, and PI medians between each experimental group and controls, as well as across all groups, revealed no significant differences in each type of vessel investigated (Table 3).

Table 3. Comparison of fetal Doppler velocimetry indexes for pregnant Wistar rats exposed to enoxaparin and unfractionated heparin, by vessel investigated.

Vessel	Index	Group					<i>p</i> *
		I (<i>n</i> = 60)	II (<i>n</i> = 60)	III (<i>n</i> = 60)	IV (<i>n</i> = 60)	V (<i>n</i> = 60)	
MCA	PSV	6.32±1.25	7.05±1.34	6.14±1.15	6.95±1.22	6.27±1.47	<i>ns</i>
	RI	0.58±0.11	0.62±0.19	0.48±0.21	0.55±0.11	0.63±0.13	<i>ns</i>
	PI	1.62±0.35	1.83±0.39	1.45±0.28	1.71±0.38	1.74±0.27	<i>ns</i>
DV	PSV	10.3±1.74	11.3±1.52	15.1±3.43	12.3±1.65	11.3±1.67	<i>ns</i>
	RI	0.54±0.15	0.53±0.28	0.51±0.79	0.55±0.45	0.49±0.35	<i>ns</i>
	PI	1.23±0.45	1.28±0.31	1.24±0.42	1.18±0.39	1.27±0.47	<i>ns</i>
UA	PSV	10.7±3.41	10.2±3.63	11.5±3.58	9.8±3.78	11.4±2.91	<i>ns</i>
	RI	0.48±0.21	0.45±0.19	0.42±0.33	0.51±0.29	0.47±0.34	<i>ns</i>
	PI	1.42±0.68	1.34±0.55	1.45±0.72	1.47±0.81	1.79±0.11	<i>ns</i>

MCA: middle cerebral artery; DV: ductus venosus; UA: umbilical artery; PSV: peak systolic velocity (cm/s); RI: resistance index; PI: pulsatility index.

**p* < 0.05 (Mann–Whitney, experimental groups vs. control group; Kruskal–Wallis, intergroup comparisons). Medians ± interquartile difference. *ns*: non-significant.

Comparisons of median VPS, RI, and PI values for right and left uterine arteries revealed no significant differences between each experimental group and control group, or across groups (Table 4).

Table 4. Comparison of Doppler velocimetry indexes for uterine arteries in pregnant Wistar rats exposed to enoxaparin and unfractionated heparin.

Uterine artery	Index	Group					<i>p</i> *
		I (<i>n</i> = 10)	II (<i>n</i> = 10)	III (<i>n</i> = 10)	IV (<i>n</i> = 10)	V (<i>n</i> = 10)	
Right	PSV	10.3±1.74	11.3±1.52	15.1±3.43	12.3±1.65	11.3±1.67	ns
	RI	0.54±0.15	0.53±0.28	0.51±0.79	0.55±0.45	0.49±0.35	ns
	PI	1.23±0.45	1.28±0.31	1.24±0.42	1.18±0.39	1.27±0.47	ns
Left	PSV	10.3±1.74	11.3±1.52	15.1±3.43	12.3±1.65	11.3±1.67	ns
	RI	0.54±0.15	0.53±0.28	0.51±0.79	0.55±0.45	0.49±0.35	ns
	PI	1.23±0.45	1.28±0.31	1.24±0.42	1.18±0.39	1.27±0.47	ns

PSV: peak systolic velocity (cm/s); RI: resistance index; PI: pulsatility index.

**p* < 0.05 (Mann–Whitney, experimental groups vs. control; Kruskal–Wallis, intergroup comparisons). Medians ± interquartile difference. *ns*: non-significant.

Discussion

Fetal ultrasonography studies conducted with pregnant rats are a promising field in perinatal experimental research, decreasing the need for euthanizing animals for the investigation of fetal development.^{10,11} Furthermore, ultrasonography is currently part of routine obstetric procedures.^{2,3,8}

International standards have established the middle cerebral artery, ductus venosus, umbilical artery, and uterine arteries as the principal vessels to investigate in fetal ultrasound examinations.⁹ Changes in fetal development and placental implantation can be inferred from the observation of abnormal hemodynamics.^{2,8,9}

Ultrasonography does not yield the false positive results often associated with other methods involving the use of drugs that effect fetal hemodynamics. In experimental research, the use of non-invasive methods can translate to fewer euthanized animals.^{3,10,11} Patterns observed in parametric measurements employing non-invasive techniques such as Doppler velocimetry allow the construction of normality scales that can find utility in the investigation of disorders affecting physiology.¹²

Doppler velocimetry was the technique selected to examine blood flow in maternal-fetal vessels after exposure to anticoagulants because these are standard vessels to be monitored for proper fetal health and development, and are part of multivessel surveillance, critical in high-risk pregnancies.⁸ Doppler observation of umbilical and uterine arteries allows evaluation of fetal health and maternal risk of pre-eclampsia.⁹ Examination of the fetal middle cerebral artery by velocimetry can yield evidence of anemia and, in cases of intrauterine growth restriction, reveal risk of hypoxic lesions. Ductus venosus waveforms help to predict fetal risk and should be taken into account when umbilical artery waveforms appear abnormal. By revealing the condition of placental vasculature in early gestation, Doppler evaluation of the uterine artery is an excellent tool to predict the risk of pre-eclampsia or intrauterine growth restriction.^{8,9}

The importance of ultrasonographic surveillance has been demonstrated in an investigation of blood flow patterns in uterine, umbilical, and middle cerebral arteries, umbilical veins, and ductus venosus in high-risk pregnancy. In the study, 88 pregnant women had these vessels measured until 72 h before delivery and the results were correlated with adverse outcomes.⁸ Correlation was observed between presence of umbilical venous pulsations and low Apgar scores at 5 min, abnormal gasometry, and need for ventilatory support. In addition, changes in umbilical artery parameters were correlated with prematurity and admission to a neonatal intensive care unit. Umbilical vein changes, however, did not correlate with adverse perinatal outcomes.⁸

In a study of blood flow in 147 single-birth pregnancies at risk for preterm labor, the role of Doppler ultrasonography was evaluated at the beginning of the second trimester to measure the risk for intrauterine growth restriction, as well as umbilical coiling index and area selection for umbilical cord testing. It was concluded that

measuring the umbilical coiling index in the second trimester can predict small-for-gestational-age births and can serve as a marker for subsequent growth restriction.¹³

Doppler flow measurements of middle cerebral arteries indirectly determine the degree of oxygenation in the fetal brain, given that fetuses with good oxygenation exhibit high RI and PI values for these vessels.^{8,9} In the present study, no differences were found in the values of PSV, PI, and MI of middle cerebral arteries between experimental groups and control group, or across groups, showing that heparin exposure did not interfere with hemodynamics or fetal oxygenation.

In the ductus venosus—a branch of the umbilical artery that carries oxygenated blood under pressure to the left atrium through the right atrium and foramen ovale—central venous pressure gradient is measured indirectly. Ventricular systole (S), ventricular diastole (D), and atrial systole (A) waves are all positive. In situations of hypoxia with increased cardiac preload, the ductus venosus exhibits an elevated PI. In cases of severe hypoxia with myocardial impairment, A-waves tend to disappear or appear reversed, indicating reversed flow to the ductus venosus.^{8,9,12} In the present study, no changes in wave morphology were observed, and comparisons of PSV, PI, and RI values revealed no significant differences between heparin-exposed groups and control group, or across groups.

In the umbilical arteries, increased RI or PI values indicate poor placental functioning.^{8,9,12} In the present sample, no significant differences in these indices were observed among the groups.

Following evaluation of these vessels, examining uterine artery flow can reveal the condition of placental implantation.⁹ In normal uterine artery flow resulting from

adequate placental implantation and trophoblast invasion, findings of RI or PI values that are elevated for gestational age indicate increased risk of intrauterine growth restriction and pre-eclampsia, owing to inadequate placentation. Evaluation of these parameters is typically performed at around 20 gestational weeks, although evaluation from 26 gestational weeks onwards—a period when trophoblast migration is complete—has been advocated.^{8,9} In the present study, no changes in uterine arteries were expected, since improved placental adhesion and trophoblastic invasion had been reported for female rats exposed to low-molecular-weight heparin.^{6,7} In fact, no significant differences in Doppler velocimetry indices were observed among groups in the present sample.

Widely employed as a diagnostic tool and highly relevant in fetal health surveillance,³ ultrasonography constitutes a reliable diagnostic resource. Exposure time, however, may require careful control, since changes in fetal intestinal,⁴ liver,⁵ and brain tissues^{14,15} as a result of tissue heating have been reported for rats subjected to prolonged exposure to ultrasound.

For the present investigation, non-fractionated and low-molecular-weight heparins were selected for administration in prophylactic and therapeutic doses.¹⁶ Some drugs can cause hemodynamic changes, whether directly or indirectly.^{12,17-19}

In the middle cerebral artery, the likelihood of changes in flow patterns is high in cases of poor cerebral formation or hypoxia.⁸ This parameter is therefore useful in the investigation of teratogenicity and brain development in studies involving drug experimentation. The effects of drugs detrimental to placentation can be measured by examining uterine artery flow. Heparins have been experimentally shown^{6,7} to improve trophoblastic invasion, a beneficial effect that supports heparin use by thrombophilic pregnant women, and also as a prophylactic measure to prevent placental thrombosis or

poor placentation and consequent fetal loss or miscarriage. No changes in Doppler flowmetry patterns of the uterine arteries and umbilical vessels were therefore expected, which is consistent with the absence of significant differences among the groups in the present study.

Monitoring Doppler velocimetry parameters is a suitable approach in large-scale studies designed to identify indices and/or markers with utility in early diagnosis and interventions for preventing undesirable outcomes.²⁰

CONCLUSIONS

No differences in Doppler velocimetry measurements were observed for median PSV, RI, or PI values in fetal middle cerebral arteries, ductus venosus, or umbilical arteries in healthy pregnant Wistar rats exposed to enoxaparin and UFH administered in prophylactic and therapeutic doses.

References

1. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, Huisman M, King CS, Morris TA, Sood N, Stevens SM, Vintch JRE, Wells P, Woller SC, Moores L. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2016; 149(2): 315-352. **doi:10.1016/j.chest.2015.11.02**
2. Maiz N, Valencia C, Kagan KO, Wright D, Nicolaidis KH. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33: 512–517. **doi: 10.1002/uog.6330.**
3. Duck FA. Hazards, risks and safety of diagnostic ultrasound. *Med Eng Phys* 2008; 30: 1338–1348. **dx.doi.org/10.1016/j.medengphy.2008.06.002**
4. Miller DL, Thomas RM. Heating as a mechanism for ultrasonically-induced petechial hemorrhage in mouse intestine. *Ultrasound Med Biol* 1994; 20: 493–503. **PMID: 7941106.**
5. Pellicer B, Herraiz S, Ta'Boas E, Felipe V, Simon C, Pellicer A. Ultrasound bioeffects in rats: quantification of cellular damage in the fetal liver after pulsed

- Doppler imaging *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37: 643–648. **doi: 10.1002/uog.8842.**
6. Erden O, Imir A, Guvenal T, Muslehiddinoglu A, Arici S, Celtin M. Investigation of the effects of heparin and low molecular weight heparin on E-cadherin and laminin expression in rat pregnancy by immunohistochemistry. *Hum Reprod.* 2006 Nov; 21(11): 3014-8. **PMID: 16997938. 22.**
 7. Zhang Y, Zhong M, Liu F. Low molecular weight heparin inhibits cell apoptosis in the placenta of rats with preeclampsia-like symptoms. *Nan Fanq Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2012 Jun; 32(6): 862-6. **PMID: 22699071.**
 8. Cheema R, Bayoumi MZ, Gudmundsson S. Multivascular Doppler surveillance in high risk pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Jul;25(7):970-4. **PMID: 21749170 doi: 10.3109/14767058.2011.602141**
 9. Kalache KD, Dückelmann AM. Doppler in obstetrics: beyond the umbilical artery. *Clin Obstet Gynecol.* 2012; Mar; 55(1):288-95. **doi: 10.1097/GRF.0b013e3182488156. PMID:22343245**
 10. Stasinopoulou M, Mantziaras G, Paronis E, Balafas E, Lelovas P, Samara A, Kostomitsopoulos N. Use of real-time ultrasonography as an alternative method for early detection, confirmation and evaluation of rat pregnancy. *Ultrasound Med Biol.* 2014; Jun; 40(6):1372-8. **doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.11.016.**
 11. Hernandez-Andrade E, Ahn H, Szalai G, Korzeniewski SJ, Wang B, King M, Chaiworapongsa T, Than NG, Romero R. Evaluation of utero-placental and fetal hemodynamic parameters throughout gestation in pregnant mice using high-frequency ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2014 Feb; 40(2):351-60. **doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.09.026. PMID:24342911**
 12. Royston P, Wright EM. How to construct 'normal ranges' for fetal variables. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998;11:30–8. **doi/10.1046/j.1469-0705.1998.11010030.x. PMID: 9511193.**
 13. Degani S, Leibovich Z, Shapiro I, Gonen R, Ohel G. Early second-trimester low umbilical coiling index predicts small-for-gestational-age fetuses. *J Ultrasound Med.* 2001; Nov;20(11):1183-8. **PMID: 11758023**
 14. Li P, Wang PJ, Zhang W. Prenatal exposure to ultrasound affects learning and memory in young rats. *Ultrasound Med Biol.* 2015; Mar; 41(3):644-53. **doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.09.015. PMID:25638314**
 15. Yang FY, Lin GL, Horng SC, Chen RC. Prenatal exposure to diagnostic ultrasound impacts blood-brain barrier permeability in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2012; Jun; 38(6):1051-7. **doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.01.017. PMID: 22424599**
 16. Erkens PM, Prins MH. Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Sep; 8(9):CD001100. **doi: 10.1002/14651858.CD001100.pub3. PMID: 20824828. 23.**
 17. Yamamoto Y, Thebaud B, Vadivel A, Eaton F, Jain V, Hornberger LK. Doppler parameters of fetal lung hypoplasia and impact of sildenafil. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; Sep; 211(3):263.e1-8. **doi: 10.1016/j.ajog.2014.03.013. PMID: 24631434**
 18. Ekin A, Gezer C, Solmaz U, Taner CE, Ozeren M, Dogan A, Uyar I. Effect of antenatal betamethasone administration on Doppler velocimetry of fetal and uteroplacental Vessels: a prospective study. *J Perinat Med.* 2016; Mar; 44(2):243-8. **doi: 10.1515/jpm-2015-0194. PMID: 26352077**

19. Galan HL, Rigano S, Chyu J, Beaty B, Bozzo M, Hobbins JC, Ferrazzi E. Comparison of low- and high-altitude Doppler velocimetry in the peripheral and central circulations of normal fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; Nov; 183(5):1158-61. **PMID: 11084558 doi: 10.1067/mob.2000.109043**
20. Spencer R, Ambler G, Brodzki J, Diemert A, Figueras F, Gratacós E, Hansson SR, Hecher K, Huertas-Ceballos A, Marlow N, Marsál K, Morsing E, Peebles D, Rossi C, Sebire NJ, Timms JF, David AL; EVERREST Consortium. EVERREST prospective study: a 6-year prospective study to define the clinical and biological characteristics of pregnancies affected by severe early onset fetal growth restriction. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017; Jan; 17(1):43. **doi: 10.1186/s12884-017-1226-7.**

Correspondence: Flavio Renato de Almeida Senefonte

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Secretaria do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento. Faculdade de Medicina.

Av. Senador Felinto Muller, s.n.

Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

Tel. +55-67-3345-7355

E-mail: flaviosenefonte@gmail.com

This investigation, conducted at the Laboratory of Experimental Surgery, Department of Clinical Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil, is part of the doctoral research of F.R.A.S at the UFMS Post-graduate Program in Health and Development of Midwestern Brazil, School of Medicine, under the advisorship of Ernesto Antonio Figueiró-Filho.

Conflicts of interest: none.

Financial sources: none.

ANEXO F- MINI-BIOGRAFIA DO AUTOR

FLAVIO RENATO DE ALMEIDA SENEFONTE

Cursou medicina na faculdade de medicina da universidade federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) entre os anos de 2000 e 2005. Na graduação por três anos foi monitor voluntário de ensino, sendo dois anos na disciplina de anatomia humana para o curso de medicina e um ano na disciplina de técnica cirúrgica para o curso de medicina. Na graduação participou de pesquisas epidemiológicas nas áreas de tabagismo e clínica cirúrgica, mas na iniciação científica junto do seu orientador, o Prof. Dr. Ernesto Antonio Figueiró-Filho, é que se destacou a produção científica concluindo oito artigos publicados, inclusive seu trabalho de conclusão de curso, na área temática epidemiológica de infecções no período gestacional. No ano de 2006 serviu a marinha como oficial médico temporário. Nos anos de 2007 e 2008 fez residência médica em cirurgia geral e se destaca nesta época a organização e edição de um livro, o “Manual do residente de cirurgia geral”, publicado pela editora UFMS no final de 2008. Já nos anos de 2009 e 2010 passou a fazer residência médica em cirurgia vascular e nesta etapa participou de trabalhos epidemiológicos nas áreas de angiologia, cirurgia vascular, angiorradiologia e ultrassonografia vascular. No ano de 2010 iniciou treinamento na área de ultrassonografia vascular com Doppler. Neste período publicou dois artigos na área vascular e foi co-autor de um capítulo de livro na área de angiorradiologia. Já ao término da residência manifestou interesse em seguir carreira acadêmica e cursar a pós graduação *Strictu sensu* procurando seu antigo orientador da iniciação científica, mas, agora para a empreitada de mestrado e doutorado. No final de 2010 começou então a desenhar um projeto de pesquisa numa área de interesse em comum para ambos, aluno e orientador, onde veio a idéia sobre

o tema anticoagulação na gestação e para tanto decidiram pela experimentação animal. Mais adiante acrescentou-se ao projeto o estudo ultrassonográfico. Então, em 2011 ingressa no curso de mestrado do programa Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da faculdade de medicina da UFMS, na área de concentração tecnologia e saúde. Em 2012 concluiu seu mestrado e ingressou no magistério superior sendo contratado como professor do curso de medicina da universidade para o desenvolvimento do estado e região do pantanal (UNIDERP) onde se encontra lecionando até hoje. Entre 2012 e 2015 foi co-autor de mais dois capítulos de livro, um na área de bioética e outro na área de cirurgia vascular. Em 2014 inicia o curso do doutorado para concluir seus achados do projeto de pesquisa iniciado em 2011. Em 2016 ingressa mediante concurso como professor do ensino superior do curso de medicina da universidade estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). Por fim, em Junho de 2017 conclui o doutorado com mais um artigo publicado. Para o futuro pretende concentrar estudos e publicações referentes a cirurgia vascular, urgência e emergências médicas, técnica cirúrgica e semiologia médica. Na área de cirurgia vascular sua concentração é sobre anticoagulação, tromboembolismo venoso, insuficiência venosa, epidemiologia e tratamento de varizes e ultrassonografia vascular com Doppler.