



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ELETROMECHANICA UTERINA EM RATAS POR BIOSUSCEPTOMETRIA AC E ELETROMIOGRAFIA

LUÍS GUSTAVO DE OLIVEIRA SIMÕES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Estrutural e Funcional*.

José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ELETROMECHANICA UTERINA EM RATAS POR BIOSUSCEPTOMETRIA AC E ELETROMIOGRAFIA

LUÍS GUSTAVO DE OLIVEIRA SIMÕES

JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Estrutural e Funcional*.

José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU – SP
2015**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Simões, Luís Gustavo de Oliveira.

Avaliação da atividade eletromecânica uterina em ratas por Biosusceptometria AC e Eletromiografia / Luís Gustavo de Oliveira Simões. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda
Capes: 20903006

1. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 2. Eletromiografia. 3. útero - Pesquisa. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Biosusceptometria AC ; Eletromiografia; Ratas; Útero.

*À minha mãe, meu pai e
meu irmão...*

Agradecimentos

À Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

À minha mãe, Sônia, pelo amor, carinho, dedicação, calma e tranquilidade desde o início da minha vida ser o meu maior exemplo de dignidade, vontade, força e fé em mim mesmo.

Ao meu pai, Luís Otávio, pelo amor, carinho, confiança em mim e suporte durante toda a vida, sendo meu amigo em todos os momentos de necessidade.

Ao meu irmão, Leonardo, por todas as brigas e risadas compartilhadas desde quando dividíamos quarto quando crianças até nos momentos complicados por quais já passei e por ser meu melhor amigo e cúmplice.

Vocês três são meus pilares e devo tudo a vocês, agradeço a educação e dedicação sempre, me mostram como a vida é e me ajudam a obter êxito nela, obrigado.

Aos meus avós, Silvino e Germina, Luís e Lourdes que ficaram tão felizes por meu ingresso numa universidade pública e por fazerem todos os meus gostos, por todo o suporte e preocupação.

A toda minha família que me suporta em todas as ocasiões, sendo certa ou errada, boa ou ruim, pela educação, por comprarem minhas várias rifas durante os três últimos anos e por tornarem meu natal e ano novo as festividades mais animadas de todas.

Aos meus amigos de Marília, por nunca deixarem de lembrar-se de mim, por fazerem dos meus finais de semanas e churrascos serem momentos marcantes e por estarem prontos sempre que precisei.

Aos meus companheiros de república, Danilo, Caio, Guilherme, Diego, Edicarlos e vizinhos que participaram da minha bagunça em casa, me acompanharam em festas, que tiveram paciência no meu aprendizado musical e fizeram meus dias sempre animados e engraçados.

Ao Fábio e Felipe, meus melhores amigos em Botucatu, pelos conselhos, estudos, festas, conversas importantes, suportarem minha teimosia, por serem companheiros sempre e amigos de verdade.

Aos meus amigos da VI Fismed, por manterem o contato pós formados, pelo companheirismo, loucuras, churrascos, pelas viagens, risadas, por gostarem de fazer música comigo e pelas amizades que levarei para o resto da minha vida, dentre outras coisas.

À minha família Bombateria, que deixaram de ser amigos e se tornaram uma família, que confiaram em mim para fazer parte desta equipe desde sempre, por me garantirem a música de toda semana e por me proporcionar viagens, risadas, loucuras e muito barulho.

Aos meus amigos de bandas, que sempre estão comigo nos eventos mais absurdos, garantindo diversão, profissionalismo e amizade.

Ao meu orientador José Ricardo de Arruda Miranda, que me aceitou como aluno de mestrado e por me proporcionar um crescimento profissional.

Aos meus amigos de Laboratório, que sempre me explicam o que eu não sei e pelas risadas e piadas durante o dia no laboratório, bem como churrascos e bares para descontrair.

Aos meus mestrandos Ronaldo, André e Juliana, que sempre juntos nos ajudamos para não perdermos prazos, documentos e obrigações na pós graduação.

Ao Fábio, Gustavo, Laís e todos os alunos de IC que me auxiliam em tudo o que eu preciso, seja pelas cirurgias nas minhas ratas, seja pelo café da manhã e da tarde, pelos momentos de descontração e gambiarras no laboratório.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, ao instituto de Biociências, ao Departamento de Física e Biofísica e ao Laboratório de Biomagnetismo, pela infraestrutura, docentes, e formação acadêmica

SUMÁRIO

Índice de Ilustrações.....	2
Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução.....	5
2. Objetivo	12
3. Metodologia.....	13
3.1 Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)	13
3.2 Eletromiografia (EMG)	14
3.3 Modelo experimental animal	15
3.3.1 Grupos Experimentais	15
3.4 Implante cirúrgico de Marcador Magnético e Eletrodos.....	15
3.5 Administração das drogas.....	16
3.6 Realização das medidas	16
3.6.1 Medidas sem administração de drogas.....	18
3.6.2 Medidas com administração de drogas	18
3.7 Análise de dados.....	19
4. Resultados e Discussão.....	20
5. Conclusão	30
6. Referências bibliográficas.....	32

Índice de Ilustrações

Figura 1: Ilustração da anatomia do útero das ratas (SOWASH, 2009).	7
Figura 2: Ilustração anatomia do útero humano (NETTER, 2000).	8
Figura 3: Diagrama do ciclo menstrual.	9
Figura 4: Ilustração da interação entre o sensor e o material magnético (CORA et al., 2005c). 13	
Figura 5: Ilustração do núcleo de ferrita. Diâmetro maior (D) e diâmetro menor (d).	16
Figura 6: Posicionamento dos eletrodos da Eletromiografia.	17
Figura 7: Posicionamento do sensor BAC e EMG durante a aquisição de dados.	18
Figura 8: Sequência experimental sem administração de droga.	18
Figura 9: Sequência experimental com administração de droga.	19
Figura 10: Exemplo ilustrativo dos perfis mecânico (BAC) e elétrico (EMG) de um útero na fase metaestro.	20
Figura 11: Exemplo ilustrativo do espectro de Fourier de um útero na fase metaestro. Evento mecânico (BAC) e evento elétrico (EMG).	21
Figura 12: Exemplo de sinal elétrico e mecânico com a aplicação de ocitocina. Contração mecânica (BAC) e elétrica (EMG).	25
Figura 13: Exemplo de um sinal original obtido através da BAC.	26
Figura 14: Exemplo de sinais com aplicação de butilbrometo de escopolamina. Contração mecânica (BAC) e elétrica (EMG).	28

Resumo

O útero é um órgão constituído de musculatura lisa, que se contrai periodicamente devido às células de marca-passo localizadas no miométrio. As técnicas *in vitro* são as mais utilizadas para estudar as mudanças no comportamento uterino, porém não promovem uma análise em ambiente fisiológico real. Este trabalho teve como principal objetivo aplicar a técnica de Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) e Eletromiografia (EMG) para estudos dos padrões elétrico e mecânico de contração uterina em ratas. O sistema BAC registra o evento mecânico através do deslocamento do material magnético inserido no meio biológico, enquanto o EMG registra a atividade elétrica da fibra muscular ativa através de estímulos na própria musculatura. Neste estudo, todas as medidas foram realizadas com ambas as técnicas atuando simultaneamente. Foram utilizadas 20 ratas Wistar não prenhes, com peso entre 200 e 300 gramas, com implantes de eletrodo e marcador magnético (MnFe_2O_4) na serosa do útero. Foi realizada uma análise das contrações em cada fase do ciclo estral e, posteriormente, foram realizadas análises utilizando drogas que alterassem o perfil normal de contração para confirmar a eficiência do método: a ocitocina e o butilbrometo de escopolamina. Os resultados mostraram que o útero, em seu estado normal, apresentou dois tipos nítidos de contração, de alta intensidade e baixa frequência ($13,62 \pm 1,503$ mHz para contração mecânica e $13,17 \pm 1,201$ mHz para contração elétrica), e de baixa intensidade e alta frequência ($62,52 \pm 4,499$ mHz para contração mecânica e $65,08 \pm 6,341$ mHz para contração elétrica). Em termos de frequência e morfologia, não foram constatadas diferenças entre as fases do ciclo estral. Em ambas as administrações de fármacos não houve uma modificação relevante quanto à frequência. A amplitude no caso da ocitocina não apresentou diferenças significativas em nenhum dos eventos (elétrico e mecânico), porém no caso de butilbrometo de escopolamina, houve uma diferença significativa neste parâmetro apenas no evento mecânico. Morfologicamente, apenas na administração de ocitocina houve uma diferença entre o padrão normal e a administração do fármaco para o evento mecânico. Os resultados demonstram a capacidade da Biosusceptometria AC associada à Eletromiografia em promover um estudo completo da contração uterina. Considerando a escassez de estudos que caracterizem o perfil destas atividades *in vivo*, esta avaliação apresenta uma alternativa eficiente para análise e contribuirá para o enriquecimento da literatura usada como base em estudos que alterem o comportamento normal do útero, como doenças, fármacos e prenhez.

Abstract

The Uterus is a smooth muscle organ that contracts periodically due to the peacemaker cells located on myometrium. *In vitro* techniques are the most used to study the change in the uterine behavior, still they lack on promoting a real physiological analyses. This main purpose of this study was to apply the Alternating Current Biosusceptometry (AC Biosusceptometry or ACB) and the Electromyography (EMG) systems to evaluate uterine electrical and mechanical patterns in rats. The ACB technique registers the mechanical event by acquiring the displacement of the magnetic material inserted in the biological system, while the EMG register the electrical activity of the active muscular fiber by stimulating the muscle itself. Both electrical and mechanical studies were conducted simultaneously. For this study, 20 non pregnant Wistar rats weighting between 200 and 300 g were submitted to the electrode and magnetic marker (MnFe_2O_4) implant surgery on the uterus serous. Thus, the contraction pattern during the entire estrous cycle was acquired, followed by the same study under influence of specific drugs (oxytocin and scopolamine butylbromide), which had the function to modify the contraction profile to confirm the method efficiency. Results showed two distinct contraction patterns for the uterus on its normal condition. The ACB and EMG systems acquired a high intensity and low frequency ($13,62 \pm 1,503$ mHz to mechanic contraction and $13,17 \pm 1,201$ mHz to electrical contraction) pattern along with a low intensity and high frequency ($62,52 \pm 4,499$ mHz to mechanical contraction and $65,08 \pm 6,341$ mHz to electrical one). Although regarding frequency and morphology, no differences were observed among the estrous cycle phases. Neither the oxytocin nor the butylbromide showed relevant interference on the frequency pattern. For the amplitude, despite the oxytocin have not presented significant differences in neither the events (electrical and mechanical), the scopolamine butylbromide showed a significant difference for the mechanical event. Still, morphologically, just the oxytocin study presented a difference between the normal pattern and the drug administration to the mechanical event. These results demonstrate the efficiency of AC Biosusceptometry associated to Electromyography in promoting a complete uterine contraction study. Considering the lack of studies characterizing the *in vivo* profile of these activities, this study presented a valuable alternative to analysis and might contribute to the literature enrichment as a starting point for studies that aim to assess changes on the uterus normal behavior, such as diseases, drugs and pregnancy.

1. Introdução

A contração muscular é um processo fisiológico característico das fibras musculares capaz de gerar tensão, ocorrendo através da interação entre os filamentos de actina e miosina presentes nas células musculares. No caso do músculo uterino, este processo é controlado por células que atuam como marca-passo e estão dispersas por todo o músculo (LECARPENTIER et al., 2011; RABOTTI et al., 2008; SHAFIK, 1997).

Diversos estudos foram realizados buscando a morfologia e a localização de células específicas de marca-passo no útero humano, porém não foram encontradas até então (GARFIELD e MANER, 2007). Alguns estudos específicos sobre este tipo de células afirmam que os potenciais de ação partem de diversas regiões, denominadas de miosítio (PARKINGTON e COLEMAN, 2001), já em outros, afirmam que aparentemente no caso do útero, qualquer célula pode se comportar como marca-passo ou propagadora de estímulo (KAO, 1959).

A porção muscular uterina, chamada de miométrio, é composta por musculatura lisa (DELLMAN e BROWN, 1983) e sua atividade eletromecânica ocorre devido à despolarização/repolarização das células de marca-passo e se propaga na forma de potenciais de ação pelas células vizinhas através de junções de *gap* (ESWARAN et al., 2002; RABOTTI et al., 2008), que são junções intercelulares de baixa resistência elétrica, promovendo uma transmissão mais rápida e eficiente de potenciais de ação (GARFIELD e MANER, 2007).

Transmitido o potencial de ação, há uma alteração na permeabilidade da membrana celular muscular, causando o influxo de Ca^{2+} , que por sua vez, se liga à calmodulina no citosol, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Este complexo ativa a miosina quinase de cadeia leve que usa ATP para fosforilar a miosina. Por fim, as pontes cruzadas fosforiladas se ligam aos filamentos de actina e os ciclos de pontes cruzadas produzem tensão e encurtamento, promovendo uma contração total do órgão (MATTHEW et al., 2004).

Agonistas como o AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico), IP_3 (Inositol Trifosfato) e algumas proteínas mostraram que também controlam as propriedades elétricas do miométrio através de canais voltagem dependentes (GARFIELD e MANER, 2007). Estudos comprovam que a progesterona e o estrógeno também

possuem efeitos sobre a contração, atuando sobre a força de resistência das membranas (GARFIELD e MANER, 2007).

Além dos agonistas e os hormônios produzidos pelo ovário, existem diversos fármacos que alteram o processo de contração uterina. De maneira geral, os estimulantes uterinos são utilizados para induzir o parto (WEI et al., 2010), provocar o aborto (WEI et al., 2010) e a hemostasia (ajuste da homeostasia) (BATHGATE et al., 2013). Já, os inibitórios uterinos são utilizados para evitar um aborto ou alívio da dismenorréia (cólica uterina) (KUNZEL et al., 2011).

O hormônio e agente farmacológico mais conhecido por sua capacidade de induzir a contração uterina, e consequentemente promover o trabalho de parto é a ocitocina (SMITH e MERRILL, 2006). É naturalmente produzida nos núcleos paraventriculares e supra-ópticos do hipotálamo e armazenada e liberada pelo lobo posterior da glândula pituitária (GUYTON e HALL, 2011). Durante o trabalho de parto, a quantidade deste hormônio aumenta no plasma e estimula a contração do útero grávido, principalmente no final da gestação. A ocitocina também auxilia na ejeção de leite materno, causando a saída deste para os ductos (GUYTON e HALL, 2011). Recentemente, um estudo dos protocolos de utilização deste agente (taxa de administração de alta ou baixa dose) mostrou que a administração de alta dose está relacionada com a redução da taxa de partos cesarianos, um pequeno aumento na taxa de aborto espontâneo e parto prematuro (WEI et al., 2010).

O butilbrometo de escopolamina, princípio ativo do Buscopan®, é um antiespasmódico que atua de forma antagonista às contrações induzidas por acetilcolinas (KUNZEL et al., 2011) e é usado cotidianamente com a função de inibir as contrações e a cólica uterina. Utilizando o músculo uterino suíno, Künzel e colaboradores constataram que o butilbrometo de escopolamina não apresentou redução das contrações uterinas, tanto em uma análise através de cateter de pressão intra-uterina quanto em uma análise através das integrais de pressão (KUNZEL et al., 2011). Provavelmente, o resultado obtido neste estudo é explicado pela metodologia empregada, onde o isolamento do órgão resulta numa inatividade da acetilcolina (KUNZEL et al., 2011).

O útero é um órgão contrátil que faz parte do grupo de músculos lisos espontaneamente ativos. Alvo de hormônios femininos produzidos pelos ovários, sua principal função está diretamente relacionada à reprodução, além de ajudar a manter o assoalho pélvico, que da sustentação à bexiga.

Apesar de anatomicamente diferentes, o útero dos roedores utilizados em laboratórios e o útero humano são semelhantes quanto à sua organização, sendo separados em três camadas: o perimétrio, o miométrio e o endométrio. O perimétrio é a cobertura visceral e intestinal do órgão; o miométrio é a camada muscular lisa que se organiza em duas camadas, musculatura circular interna e musculatura longitudinal externa; e o endométrio cobre toda a cavidade uterina (NETTER, 2000).

Nas ratas utilizadas em laboratório (*Rattus Norvegicus*) o útero é duplo, ou seja, é constituído por dois canais cervicais (cavidades) distintos partindo de uma vagina simples (COOPER e SCHILLER, 1975; MARTINS et al., 2011). Já em humanos, o útero possui apenas uma cavidade cervical partindo de uma vagina simples (NETTER, 2000). A presença das duas cavidades nos roedores possibilita a acomodação de vários embriões, fato que não ocorre nos seres humanos (SOWASH, 2009). As figuras 1 e 2 ilustram o órgão no caso das ratas e no caso dos humanos, respectivamente.

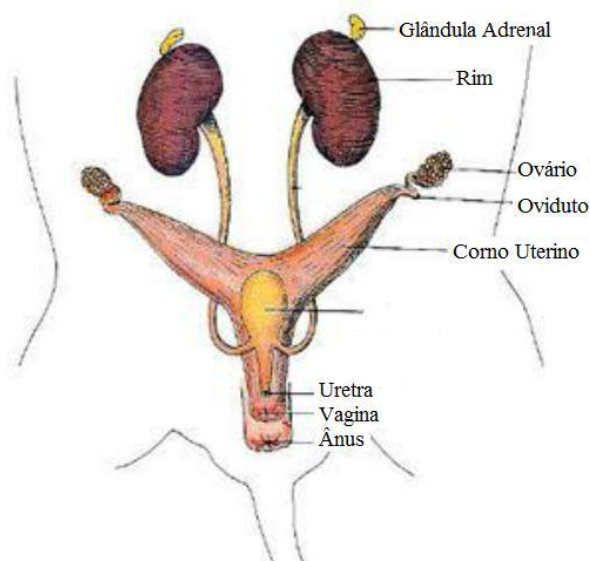


Figura 1: Ilustração da anatomia do útero das ratas (SOWASH, 2009).

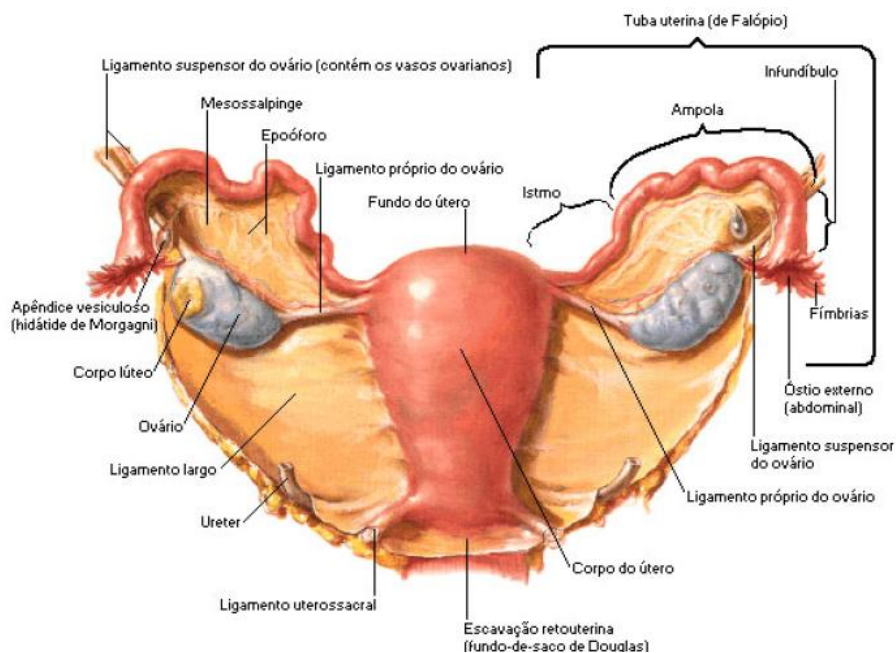


Figura 2: Ilustração anatomia do útero humano (NETTER, 2000).

O ciclo estral das ratas tem duração de 4 a 6 dias e é dividido nas seguintes fases: proestro, estro, metaestro e diestro. Durante a fase proestro, há o pico de ação do estrógeno; no estro, ocorre a ovulação e o pico de progesterona (cio); no metaestro, os hormônios retornam ao seu nível basal; e no diestro, o estrógeno inicia sua atividade, reiniciando todo o ciclo (GOUVEA JR et al., 2009).

Em humanos, o ciclo ovulatório é chamado de ciclo menstrual, e diferentemente das ratas, tem duração de 28 dias. Após a menstruação (duração de aproximadamente 5 dias), o nível de estrógeno começa a aumentar gradativamente, enquanto o nível de progesterona, de FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (luteinizante) permanecem baixos. No 12º dia, o nível de estrógeno permanece aumentando e, os níveis de FSH e LH começam a aumentar. O nível de progesterona ainda permanece em seu valor basal. No 13º dia, o estrógeno, o FSH e o LH chegam em seu valor máximo e então seus níveis caem bruscamente, causando a ovulação no 14º dia. Entre o 14º dia e o 28º, os níveis de FSH e LH permanecem caindo até atingirem seu valor mínimo (24º dia), enquanto a progesterona e o estrógeno sofrem um aumento gradativo, onde a progesterona atinge seu valor máximo e o estrógeno atinge seu valor médio (ambos ocorrem no 21º dia). No 24º dia, os níveis de estrógeno e progesterona caem gradativamente atingindo seu mínimo no 28º dia, onde ocorre a menstruação e reinicia-

se todo o ciclo (GUYTON e HALL, 2011). A figura 3 apresenta um diagrama do ciclo menstrual completo.

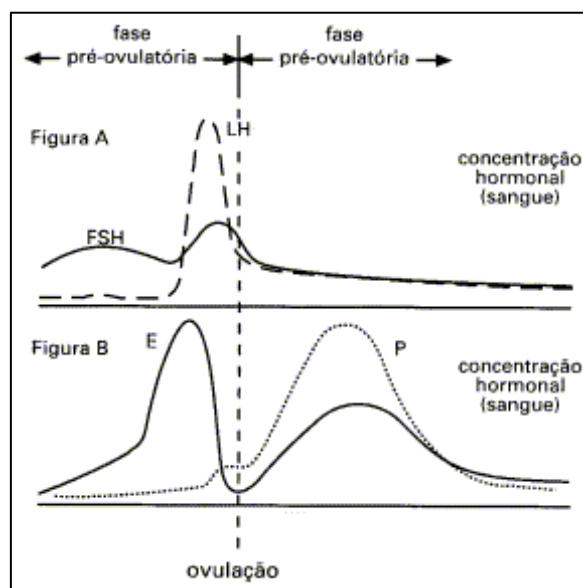


Figura 3: Diagrama do ciclo menstrual.

Dentre os diversos modelos experimentais existentes, o modelo animal apresenta uma alternativa interessante para estudos biológico, pois através dele é possível realizar experimentos em uma espécie visando a comparação e a compreensão dos fenômenos desejados em outra espécie (ANDREATINI, 2002). Desta forma pode-se controlar as variáveis indesejáveis durante a experimentação e realizar uma análise mais específica do fenômeno estudado. Além disto, a praticidade e a facilidade em se obter um espaço amostral eficiente para uma análise tornam este método extremamente vantajoso em estudos que envolvam o corpo humano.

As técnicas de determinação de padrões de contração uterina *in vitro* são bastante utilizadas neste tipo de estudo devido à precisão dos resultados obtidos. Estes métodos geralmente consistem na retirada de uma amostra de tecido uterino, que é tratada quimicamente de acordo com o objetivo do estudo (HURD et al., 1998; MUNGLUE et al., 2013; SHEW et al., 1990;1992) para posterior análise. Apesar de preparos diferentes e específicos, os métodos *in vitro* resultam na morte de muitos animais para obtenção de um tamanho amostral confiável, além de representar uma situação isolada do tecido.

Neste sentido, buscam-se metodologias de avaliação *in vivo*, sem interferência na atividade eletromecânica. A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma alternativa magnética para análise de sistemas biológicos. O seu mecanismo de análise é

baseado na interação entre um campo magnético externo e um material magnético inserido no meio biológico. Desta forma, de acordo com a concentração ou a posição deste marcador, é possível registrar o evento biológico desejado. A BAC possui diversas aplicações, como o estudo de parâmetros do trato gastrointestinal, como atividade de contração gástrica em ratos (AGOSTINHO et al., 2010; AMERICO et al., 2010a), esvaziamento gástrico em humanos (BAFFA et al., 1995; MIRANDA et al., 1992), atividade de contração gástrica em humanos (MIRANDA et al., 1997) e em cães (MORAES et al., 2003), em processos de liberação de fármacos (CORA et al., 2003; CORA et al., 2008; CORA et al., 2006a; CORA et al., 2006b; CORA et al., 2005b) e na obtenção de imagens em processos biofarmacêuticos (CORA et al., 2005a).

Por outro lado, a Eletromiografia (EMG) é empregada para avaliar a atividade elétrica de músculos e nervos. Em meados dos anos de 1791, Luigi Galvani observou que existia uma correlação entre a eletricidade e a musculatura; em 1832, Carlo Matteucci demonstrou que a corrente elétrica era gerado nos músculos. Finalmente, em 1849, Du Boys-Reymond construiu o primeiro galvanômetro para aferição de correntes elétricas e reduziu a impedância da pele. A partir desta data, com o aumento da tecnologia e do conhecimento, a técnica passou por diversas modificações que otimizaram o sistema e tornou esta ferramenta confiável e de extrema importância no cenário da análise biológica. O seu princípio de análise consiste na aquisição de sinais elétricos produzidos nas fibras musculares.

Ao longo dos anos, diversos estudos foram realizados utilizando a EMG e, em particular, foi aplicada em humanos para analisar a distribuição energética uterina durante a gestação (MOSLEM et al., 2010), obtendo resultados que afirmam que a energia aumenta de acordo com o aumento da alta frequência de contração.

Em estudos anteriores (AMERICO et al., 2010b) realizados pelo grupo de Biomagnetismo do IBB-UNESP, empregou-se a BAC associada com a EMG para avaliar a atividade eletromecânica gástrica, obtendo informações importantes sobre a função de contração e seu controle elétrico.

Buscando uma análise semelhante, ao associar a BAC com a Eletromiografia (EMG) para avaliar atividades uterinas foi implementado um modelo capaz de detalhar os processos mecânico e elétrico envolvidos na contração do útero em uma experimentação *in vivo* sem a necessidade de eutanásia dos animais. Assim, os mesmos animais submetidos a cada teste se tornam o controle do próprio experimento, visando uma análise tempo/frequência/amplitude dependente, buscando uma padronização do

modelo desta atividade, sobre condições fisiológicas e farmacológicas reais. Os resultados obtidos neste projeto pioneiro poderão servir como base para novos estudos sobre a influência de patologias, variações hormonais e genéticas, drogas e outros agentes no perfil elétrico e mecânico das contrações uterinas.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho, em termos gerais, é avaliar a atividade de contração uterina em ratas utilizando a Biosusceptometria de Corrente Alternada associada à Eletromiografia.

Especificamente:

- Obter o perfil de atividade elétrica e mecânica para as fases do ciclo estral do animal, observando as diferenças e particularidades nos perfis obtidos;
- Correlacionar a atividade elétrica com a atividade mecânica em cada fase do ciclo estral encontrada;
- Quantificar e qualificar os padrões obtidos em cada fase do ciclo estral e identificar a fase de maior atividade e modificações em frequência;
- Provocar a alteração do padrão obtido por meio da administração de Ocitocina (controle positivo) e Buscopan® (controle negativo), e correlacionar as atividades elétrica e mecânica frente às modificações induzidas pelas drogas.
- Quantificar e qualificar os diferentes padrões obtidos pelo controle positivo e controle negativo e comparar com o padrão normal para verificar suas diferenças.

3. Metodologia

Este estudo está sendo desenvolvido no laboratório de Biomagnetismo, do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, em parceria com o Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

3.1 Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)

Os sensores magnéticos podem ser considerados, basicamente, um par de transformadores com núcleo de ar, onde as bobinas primárias (externas) funcionam como excitadoras e as secundárias (internas) como detectoras (arranjo coaxial) (figura 3). Cada par é separado por uma linha de base, estando as detectoras dispostas em uma configuração gradiométrica de primeira ordem, ou seja, enroladas em sentidos contrários de modo que os fluxos magnéticos concatenados em cada bobina detectora sejam subtraídos, eliminando os ruídos ambientais e aumentando sua sensibilidade (CORA et al., 2005c).

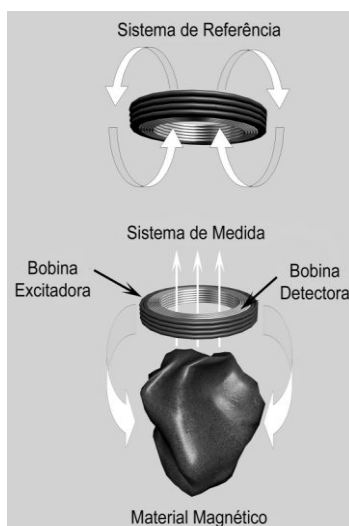


Figura 4: Ilustração da interação entre o sensor e o material magnético (CORA et al., 2005c).

Pela configuração gradiométrica do sistema, na ausência de qualquer material magnético, o sensor permanece balanceado e o sinal obtido é minimizado. Entretanto, a aproximação de qualquer material magnético provoca maior concatenação do fluxo magnético sobre a bobina detectora mais próxima, sendo que esse desbalanceamento no

fluxo gera uma força eletromotriz (*fem*) de saída proporcional à massa e forte dependência com a distância entre o material e o sensor. Essa *fem* pode ser medida, digitalizada e registrada continuamente com o auxílio de um amplificador sensível à fase “Lock-in”, uma placa analógico/digital e um computador. Assim, através da fixação de um material magnético à uma região de interesse, é possível registrar o processo de contração que ocorre nesta região pela variação de posição do material magnético.

O sensor utilizado neste trabalho apresenta as características específicas para análises biológicas em animais de pequeno porte. A tabela 1 apresenta suas especificações.

Tabela 1: Especificações do sensor BAC.

Linha de base [cm]	15
Diâmetro da superfície de detecção [cm]	4
Área de detecção [cm ²]	50,3
Nº de voltas da bobina excitadora	150
Fio da bobina excitadora [mm]	AWG 24
Resistência do fio da bobina excitadora [Ω]	4,3
Nº de voltas da bobina detectora	280
Fio da bobina detectora	AWG 32

3.2 Eletromiografia (EMG)

A eletromiografia é uma técnica que permite a aquisição de sinais elétricos (pulsos elétricos) das fibras musculares ativas através da estimulação de unidades motoras (UMs) (STENSDOTTER et al., 2003).

Sendo o seu sinal uma soma algébrica de todos os sinais de uma determinada região, este sofre os efeitos de diversos parâmetros inerentes ao corpo humano (musculatura, fisiologia, anatomia, sistema nervoso periférico), bem como intrínsecos à própria instrumentação (eletrodos e componentes eletrônicos) (ENOKE, 2000). Dentro da EMG estão presentes diversas técnicas que promovem esta análise elétrica, como: captação, amplificação, filtragem, aquisição em software, interpretação e análise do sinal.

Com o influxo do íon Ca^{2+} ocorre a despolarização da membrana pós-sináptica e essa movimentação iônica gera um campo elétrico na superfície muscular, deste modo é realizada a somatória temporal e espacial dos potenciais de ação individuais de todas as fibras musculares totalizando o potencial de ação da unidade motora (PAUM) (STENSDOTTER et al., 2003).

Assim como dito anteriormente, o PAUM depende de vários fatores, dentre eles fisiológicos, tempo de disparo, características das membranas e das fibras musculares, além de fatores técnicos, como posição dos eletrodos, tamanho e formato do eletrodo e método de tratamento de sinais obtidos (filtros utilizados) (ESCAMILLA et al., 2001; KARLSSON e GERDLE, 2001).

Com o eletrodo inserido na serosa do animal, ao lado do núcleo de ferrita, é possível avaliar a atividade elétrica com maior precisão.

3.3 Modelo experimental animal

Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Wistar com idade entre 10 a 15 semanas, pesando entre 200-300g, provenientes do Laboratório ANILAB e mantidos no Biotério da Fisiologia do instituto de Biociências de Botucatu. As ratas foram mantidas em regime claro/escuro de 12 horas, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de $50 \pm 10\%$ e alimentação (água e ração) *ad libitum*.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – IBB) sob o protocolo de número 514 - CEUA.

3.3.1 Grupos Experimentais

- Grupo 1: 10 ratas Wistar para análise de fases do ciclo estral;
- Grupo 2: 10 ratas Wistar para análise de controle positivo e negativo.

3.4 Implante cirúrgico de Marcador Magnético e Eletrodos

Os anestésicos utilizados para a realização da cirurgia de implante do conjunto (marcador e eletrodo) na serosa uterina foi a ketamina/xilazina (0,1 mg/kg IM). O eletrodo é do tipo marcapasso cardíaco (*Ethicon - Johnson & Johnson*) com fio conduzido por meio de tunelamento subcutâneo e exteriorizado por uma incisão no topo do pescoço. O marcador magnético é um fragmento (núcleo) com 0,15 g de ferrita (MnFe_2O_4), com diâmetro maior de 4,2 mm e 1,15 mm de diâmetro menor (figura 4). Ambos foram implantados próximos ao ovário direito.

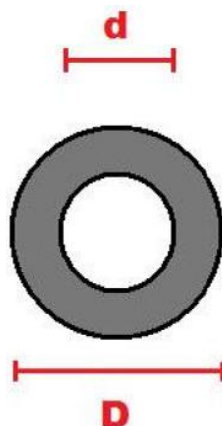


Figura 5: Ilustração do núcleo de ferrita. Diâmetro maior (D) e diâmetro menor (d).

3.5 Administração das drogas

Para a realização do controle positivo, foi administrado 1 ml de ocitocina sintética padronizada (10UI/ml, Placentex®, Egenger União).

Para o controle negativo, foram administrados 2 ml de butilbrometo de escopolamina não composto (10mg/ml, Buscopan®, Boehringer Ingelheim).

Ambas as administrações foram subcutâneas e ambos os fármacos foram adquiridos em farmácia comum.

3.6 Realização das medidas

Para a realização das medidas, os animais foram pesados e anestesiados com Pentobarbital Sódico (40 mg/kg, Hypnol®, Syntec) via intraperitoneal. Foram posicionados em decúbito dorsal com o sensor BAC posicionado sobre o marcador magnético e ligado ao *Lock-in* (Stanford Research System, modelo SR830 DSP) e ao amplificador (Techvox, modelo TIP800 Ω 2 AB “Second Generation”). Os parâmetros de ajuste para a instrumentação estão demonstrados na tabela 2. Os eletrodos do EMG foram conectados à rata e ligados ao sistema de aquisição de dados (Biopac MP150 com módulo específico para EMG) na configuração bipolar com o seguinte arranjo: o eletrodo principal (ou de medida) foi implantado na serosa da rata, o eletrodo de referência posicionado na lateral esquerda do abdômen do animal e o eletrodo de aterramento fixado no membro inferior direito (figura 5). A aquisição de dados por

BAC e EMG ocorreu simultaneamente durante 30 minutos. A figura 6 demonstra como foi posicionado o sensor BAC e os eletrodos da EMG durante as medidas.

Tabela 2: Valores de ajustes do *Lock-in*, amplificador e software.

Frequência do <i>Lock-in</i> [kHz]	10
Amplitude do <i>Lock-in</i> [V]	0,7
<i>Sensitivity</i> do <i>Lock-in</i> [mV]	50
Amplificação do sinal [dB]	-3
Frequência de Amostragem [Hz]	20

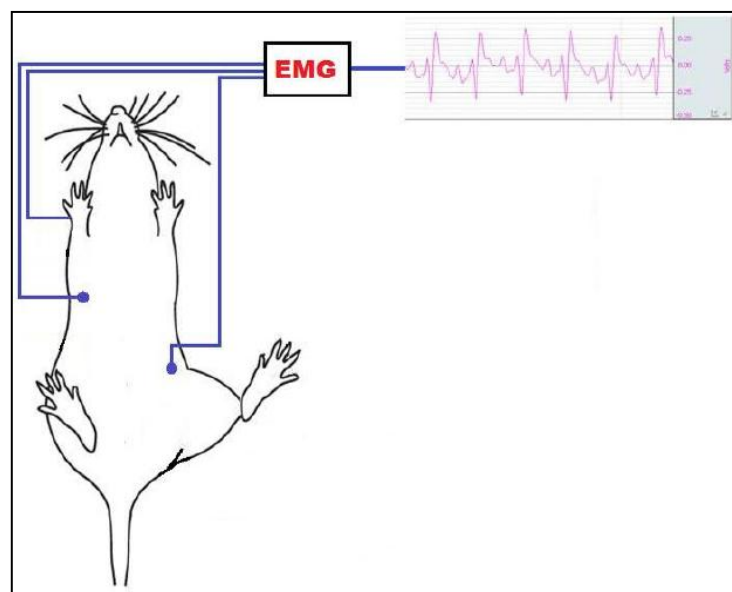


Figura 6: Posicionamento dos eletrodos da Eletromiografia.

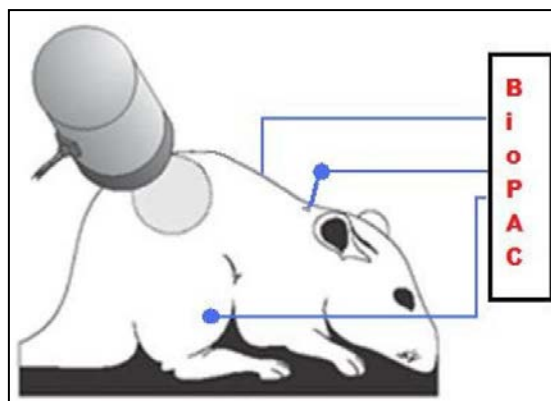


Figura 7: Posicionamento do sensor BAC e EMG durante a aquisição de dados.

3.6.1 Medidas sem administração de drogas

Após 7 dias de recuperação da cirurgia de implante do conjunto (eletrodo e marcador magnético), foi realizado o esfregaço vaginal, pela manhã entre as 8 e 9 horas (MARCONDES et al., 2002), para identificação microscópica da fase do ciclo estral de cada rata do grupo 1. Constatada a fase do ciclo antes de cada medida, o animal foi submetido à aquisição de dados. A figura 7 apresenta a sequência experimental realizada.

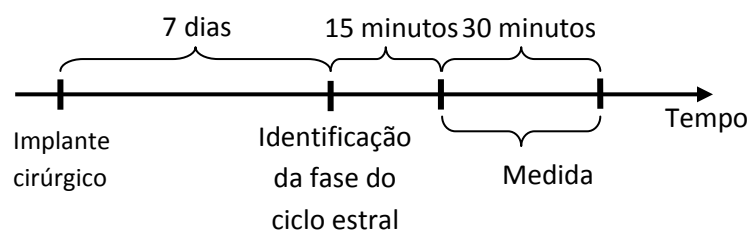


Figura 8: Sequência experimental sem administração de droga.

Após a cirurgia de implante do conjunto (eletrodo e marcador magnético) nos animais do grupo 2, esperou-se a recuperação dos mesmos durante uma semana. O animal então foi submetido à medida. Primeiramente realizava-se o controle da própria medida com 30 minutos de aquisição de dados com o animal em seu estado normal; administrava-se o fármaco (sem interrupção da medida), ocitocina ou butilbrometo de escopolamina, e adquiriam-se mais 60 minutos de dados.

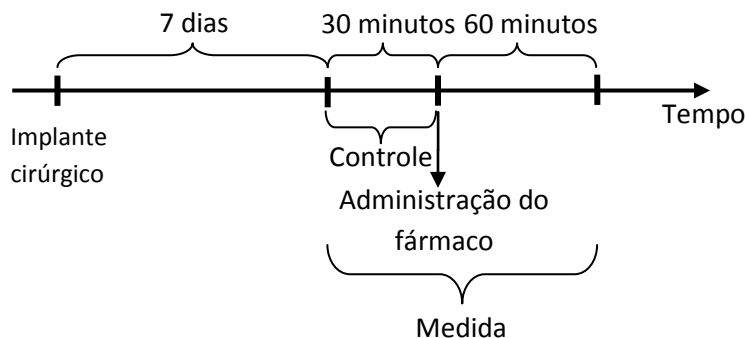


Figura 9: Sequência experimental com administração de droga.

3.7 Análise de dados

Os dados foram adquiridos através do software Acknowledge 4.0.1® e salvos em formato ASCII para posterior processamento em ambiente Matlab®. A análise dos resultados referentes à atividade mecânica e elétrica foi realizada através de inspeção morfológica qualitativa para identificação do perfil de curva para cada situação proposta. No espaço recíproco foram analisadas as bandas de frequências através de uma Transformada Rápida de Fourier (FFT) e análise espectral através da *Running Spectrum Analysis* (RSA). A FFT e a RSA são formas alternativas de análise de dados. Diferentemente do comum, onde o sinal é expresso através da amplitude em função do tempo, o sinal é representado através da quantidade de informação existente nas diferentes frequências. Esta transformação do sinal é realizada através de inúmeras equações matemáticas que decompõe o sinal em uma somatória de senos e cossenos.

Foram comparados entre si os resultados de cada fase do ciclo estral e a variação do controle positivo (ocitocina) e controle negativo (Buscopan®). Também, foram comparadas e correlacionadas as variações no perfil de contração com e sem a administração das drogas. A estatística foi realizada através do teste *t-Student*.

4. Resultados e Discussão

Na primeira etapa do experimento foram obtidos gráficos do processo de contração elétrica e mecânica para cada animal do grupo 1. Nas fases estro, diestro e metaestro, foi utilizado um $n = 8$. Na fase proestro, fase mais rápida do ciclo (12 horas de duração), houve uma dificuldade em se obter um n igual às outras fases, porém, apesar de um $n = 3$, os sinais obtidos no proestro mostraram-se semelhantes aos obtidos nas outras fases. A figura 10 apresenta um exemplo dos sinais mecânico e elétrico adquiridos nesta etapa do estudo.

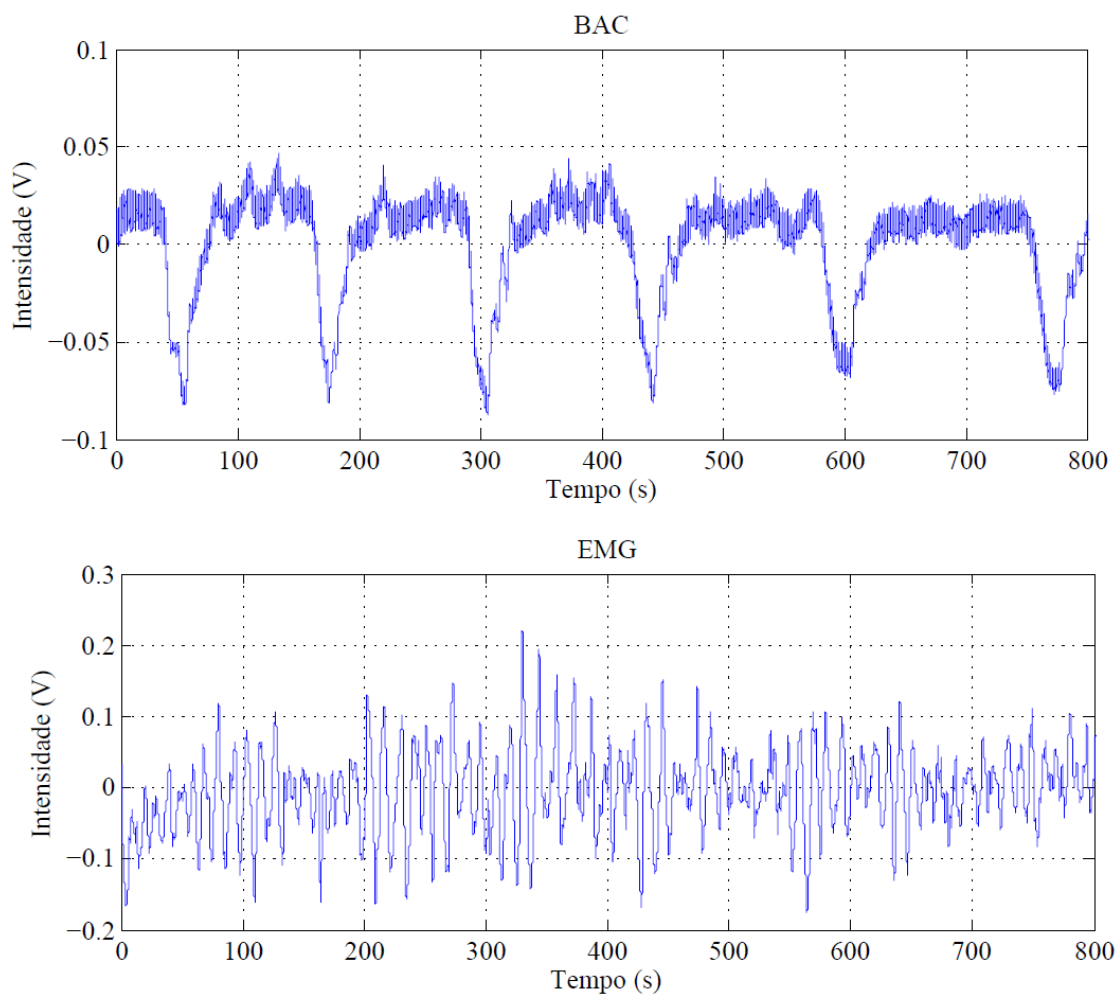


Figura 10: Exemplo ilustrativo dos perfis mecânico (BAC) e elétrico (EMG) de um útero na fase metaestro.

No sinal mecânico apresentado, são observados diversos picos de alta intensidade intercalados com picos de menor intensidade. As projeções no sentido negativo ao eixo de intensidade (eixo y) indicam o afastamento do núcleo de ferrita do sensor, fato que nos permite concluir que esta contração é de forte intensidade, onde o útero se contrai de maneira aguda, reduzindo o seu tamanho em relação ao tamanho

natural. Uma inspeção subjetiva da intensidade mostrou que ela é extremamente variável, não apresentando um padrão nem para o mesmo animal e nem para uma mesma fase do ciclo estral.

Na literatura, em estudos *in vitro*, apesar de diferentes raças de ratas e diferentes estados uterinos (prenhes ou não) (MUNGLUE et al., 2013; PHELPS e PEULER, 2010; WONG et al., 2013), a baixa frequência estava entre 4 e 15 mHz. Através da transformada de Fourier, exemplificada na figura 11, dos resultados obtidos por Biosusceptometria AC, a frequência encontrada está de acordo com a literatura, entre 5 e 18 mHz. Segundo Alvarez e Caldeyro-Barcia, em seus estudos realizados em humanos durante todo o período de gravidez, esta contração de baixa frequência e alta intensidade, chamadas de “Braxton-Hicks”, estão presentes durante todo o tempo de vida uterina, e tendem a aumentar sua frequência e periodicidade de acordo com a aproximação do parto (NEWMAN, 2005).

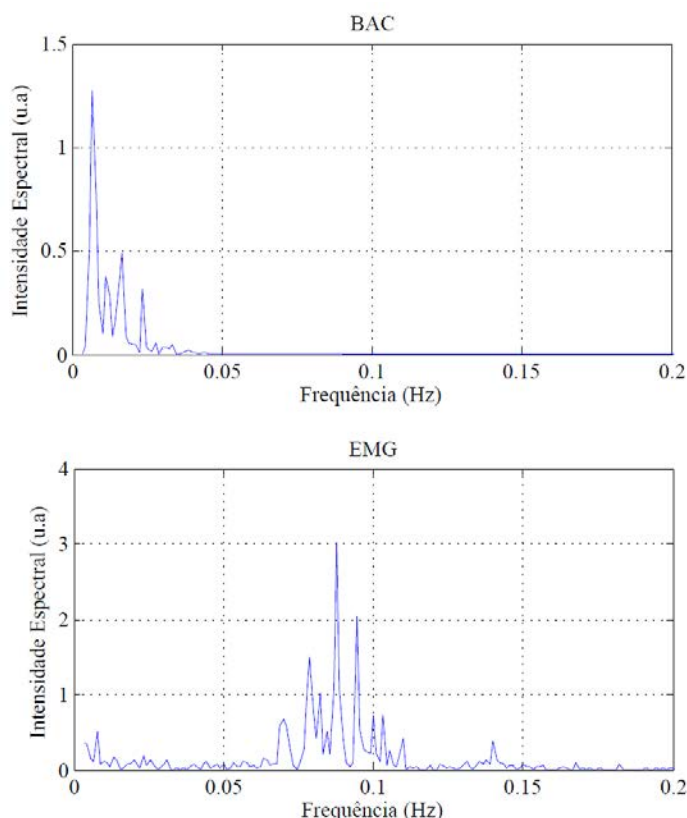


Figura 11: Exemplo ilustrativo do espectro de Fourier de um útero na fase metaestro. Evento mecânico (BAC) e evento elétrico (EMG).

Ainda no sinal mecânico, são observados diversos picos de alta frequência e de baixa intensidade. Assim como citado por Alvarez e Caldeyro-Barcia, “o útero nunca dorme”, e estas contrações de menor intensidade e de alta frequência, chamadas de

“ondas de Alvarez”, estão presentes também durante toda a vida uterina. Elas representam a atividade local uterina dessincronizada (NEWMAN, 2005), e em nosso estudo estas frequências variaram entre 30 e 90 mHz.

Além das duas frequências mencionadas acima, foi encontrada uma frequência que varia entre 20 e 25 mHz. Esta é a frequência da duração da contração de alta intensidade. Notamos que com o aumento da base da contração aguda (ondas de alta intensidade) esse valor tende a se aproximar de 20 mHz. O contrário também é verdadeiro, isto é, o estreitamento, com esse valor tendendo a 25 mHz. Como a duração da contração é variável, esta frequência apresenta uma grande variabilidade na morfologia do sinal.

Na eletromiografia, o sinal exemplificado na figura 10 apresenta uma morfologia diferente do sinal mecânico. Enquanto o sinal mecânico apresenta picos de alta intensidade nítidos, o mesmo não é observado em todos os sinais elétricos. Esperávamos no sinal elétrico algo parecido com o encontrado na literatura, platôs com estouros (“bursts”) contendo sucessivos picos de despolarização (“spikes”) durante todo o tempo de contração intensa (WIKLAND e LINDBLÖM, 1985), porém isto não foi observado no sinal. Diversos picos de baixa intensidade estão presentes durante todo o teste, indicando que o útero, assim como qualquer músculo liso, permanece movimentando cargas por sua membrana celular durante todo o tempo. A diferença destes picos para um potencial de ação, é que a movimentação de cargas é de baixa concentração, não sendo capaz de gerar um potencial de ação desencadeador de uma contração de alta intensidade.

A explicação da diferença de sinal elétrico entre este estudo e a literatura está na maneira com que o estudo foi realizado. Na literatura, em sua maioria, tiras longitudinais de músculo liso uterino foram retiradas para análise *in vitro* através de transdutores de força associados à eletromiografia. Desta maneira, é possível isolar tanto mecanicamente quanto eletricamente os processos que acontecem no miométrio uterino, que através de filtragens de sinais, promove uma visualização limpa do processo. Por um lado este tipo de análise é vantajosa, porém, como a proposta desde trabalho é promover uma análise *in vivo*, não era viável se utilizar destas técnicas. Sendo assim, o sinal encontrado no EMG é um somatório de todo o processo elétrico que ocorrem na região do eletrodo, ou seja, além de captar o movimento elétrico do músculo longitudinal, ele capta o movimento elétrico do músculo circular, disposto

mais internamente no miométrio, bem como outros sinais elétricos provenientes de outras células em sua proximidade.

Apesar do ruído presente no sinal elétrico, a baixa frequência encontrada no sinal mecânico, através da transformada de Fourier (exemplificada na figura 11), foi também encontrada no sinal elétrico, variando entre 6 e 20 mHz, bem como a alta frequência, variando entre 30 e 90 mHz.

Apesar de observarmos um acoplamento dos sinais na figura 10, isto não foi visualizado em todos os sinais, mostrando que a contração mecânica nem sempre está acoplada à contração elétrica. Através de inspeção qualitativa dos sinais e análise das frequências, constatamos que há uma variação entre ambos os processos. Nos resultados foram visualizados muitas vezes a presença de platôs de contração elétrica próximos aos picos intensos de baixa frequência de contração mecânica. Apesar de possuírem padrões similares para as frequências altas e baixas, não há um acoplamento perfeito entre a ação mecânica e a ação elétrica, e dificilmente o pico encontrado no espectro de Fourier para ambas as contrações se sobrepõem.

A tabela 3 apresenta uma comparação entre as médias obtidas em cada faixa de frequência, baixa (BF) e alta (AF), para cada tipo de contração e em cada fase do ciclo estral. Comparando o sinal mecânico e elétrico, quanto à média em cada faixa de frequência, nos permite concluir que dentro das fases do ciclo estral não há uma diferença evidente, mostrando a proximidade entre estes processos de contração uterina.

Uma comparação das médias obtidas entre as fases do ciclo estral para cada faixa de frequência também é apresentada na tabela 3. Observando os valores para as contrações mecânicas, notamos que entre os ciclos não houve uma diferença significativa, assim como observado nos valores para as contrações elétricas. Foi realizado o teste *t-Student* não pareado entre as fases do ciclo estral, para cada faixa de frequência e em cada tipo de contração, apresentando um valor de $p > 0,05$ em todos os casos.

Tabela 3: Médias obtidas para cada frequência em cada tipo de contração.

	Frequência mecânica [mHz]	Frequência elétrica [mHz]
Estro		
BF	11,7 ± 2,20 ^a	11,8 ± 3,09 ^c
AF	63,97 ± 11,51 ^b	65,95 ± 7,12 ^d
Diestro		
BF	13,64 ± 3,19 ^a	13,85 ± 4,58 ^c
AF	62,13 ± 11,51 ^b	66,05 ± 5,46 ^d
Metaestro		
BF	11,96 ± 4,10 ^a	12,58 ± 4,55 ^c
AF	67,36 ± 10,87 ^b	71,81 ± 9,02 ^d
Proestro		
BF	14,9 ± 5,58 ^a	14,45 ± 7,84 ^c
AF	56,6 ± 6,92 ^b	56,5 ± 4,94 ^d
Média Geral		
BF	13,05 ± 1,50	13,17 ± 1,20
AF	62,52 ± 4,49	65,08 ± 6,34
Dados apresentados como média ± desvio padrão.		
^a		
^b		
^c p > 0,05 – Sem diferença estatística significativa.		
^d		

Na segunda parte deste trabalho, foram realizadas medidas com administração de drogas: Ocitocina e Buscopan®. Realizando este controle positivo e negativo, foi possível observar as mudanças no perfil de contração uterina obtido como padrão, e garantir que a atividade biológica que as técnicas utilizadas estavam mensurando realmente pertencia ao útero.

Observando a figura 12, onde é apresentado um exemplo do sinal obtido para a aplicação de ocitocina, é possível visualizar a diferença entre o padrão normal de contração uterina, antes da aplicação do fármaco, e após a aplicação do mesmo. No sinal mecânico, antes da aplicação de ocitocina, é visualizada a morfologia de contração mecânica previamente descrita neste trabalho, apresentando as altas e baixas frequências dentro do padrão já obtido e com amplitude variável, estando esta entre 0,017 e 0,08 V.

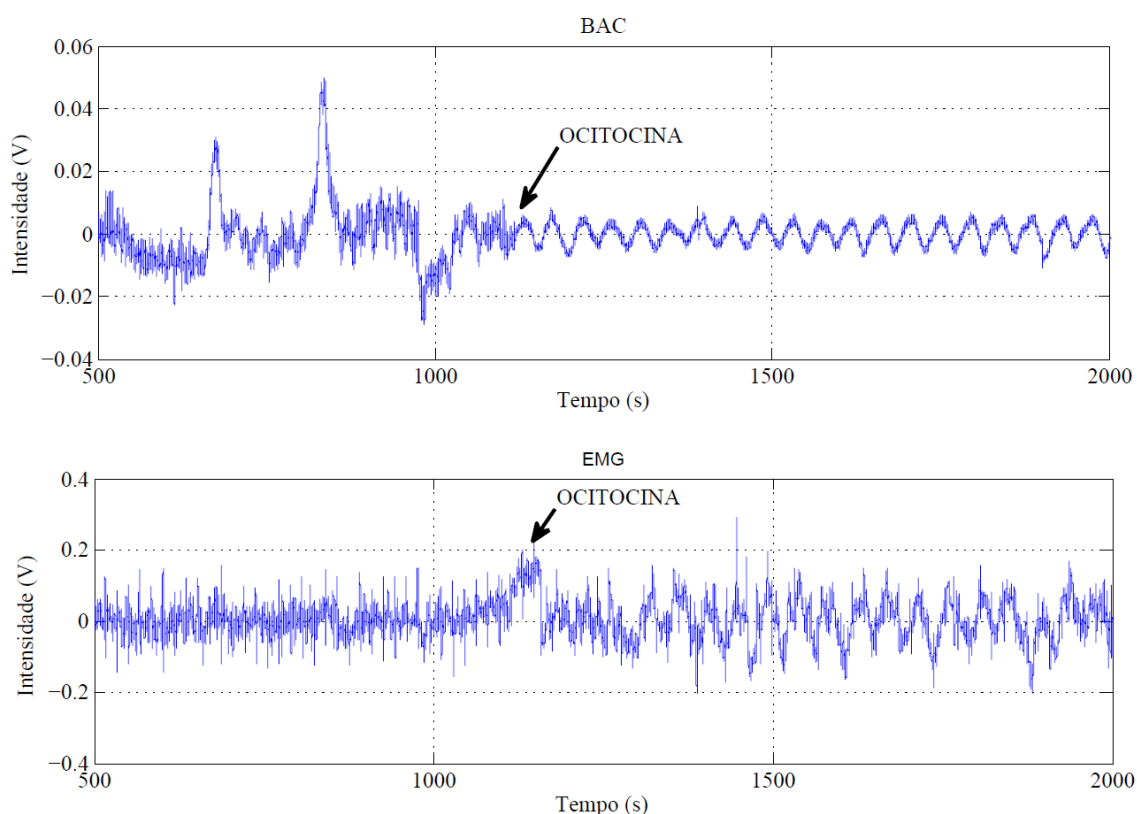


Figura 12: Exemplo de sinal elétrico e mecânico com a aplicação de ocitocina. Contração mecânica (BAC) e elétrica (EMG).

Após a aplicação do fármaco, no sinal mecânico é observada uma modificação completa na morfologia do sinal, que passa a ser coordenado e melhor definido visualmente, sugerindo que há um acoplamento das camadas musculares uterinas (circular e longitudinal). Apesar de parecer visualmente que a amplitude possui um valor constante, esta apresentou valores que variaram entre 0,025 e 0,36 V. Em relação à frequência, não foi observado uma alteração brusca como era esperado. No Espectro de Fourier foi quantificado um valor de baixa frequência que variou entre 22 e 25 mHz e um valor de alta frequência entre 30 e 90 mHz.

No sinal elétrico, na figura 12, é observado que não houve uma mudança brusca como a observada no sinal mecânico. Antes da administração de ocitocina o sinal apresentou a morfologia padrão previamente descrita, com frequências próximas às encontradas no sinal mecânico e com amplitude variando entre 0,075 e 0,018 V. Após a aplicação do fármaco, foi mantida a morfologia do sinal, a frequência também foi quantificada com valores próximos à frequência mecânica pós administração, e com amplitudes variando entre 0,11 e 0,43 V.

A tabela 4 apresenta os valores de média para as amplitudes antes e após a administração da ocitocina. Através do teste *t-Student* pareado é confirmada a hipótese de que não há uma diferença significativa entre o processo de contração antes e depois da aplicação do fármaco, tanto para o evento mecânico, quanto para o evento elétrico. O valor obtido foi $p > 0,05$ em ambos os casos.

Tabela 4: Médias obtidas antes e depois da administração de ocitocina.

	Antes [V]	Depois [V]
BAC	$0,04 \pm 0,03^a$	$0,13 \pm 0,12^a$
EMG	$0,10 \pm 0,05^b$	$0,20 \pm 0,13^b$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão

^a $P > 0,05$ – Sem diferença estatística significativa.

^b $P > 0,05$ – Sem diferença estatística significativa.

Apesar de não haver diferença significativa entre as frequências e amplitudes após a aplicação do fármaco, o sinal mecânico apresentou um comportamento característico antes de promover a coordenação da contração. A figura 13 apresenta um sinal original, ou seja, sem a exclusão de artefatos que interferem na quantificação do sinal. Nota-se que ao se aplicar a ocitocina há uma queda brusca no patamar de propagação do sinal. A explicação para este fato está na maneira que o fármaco realiza sua função de coordenação, provavelmente este promove uma contração inicial fortíssima capaz de alterar e manter o tônus muscular uterino, ou seja, a partir desse momento o músculo possui uma tensão maior e conseqüentemente o órgão possui um volume menor enquanto está sob o efeito da ocitocina.

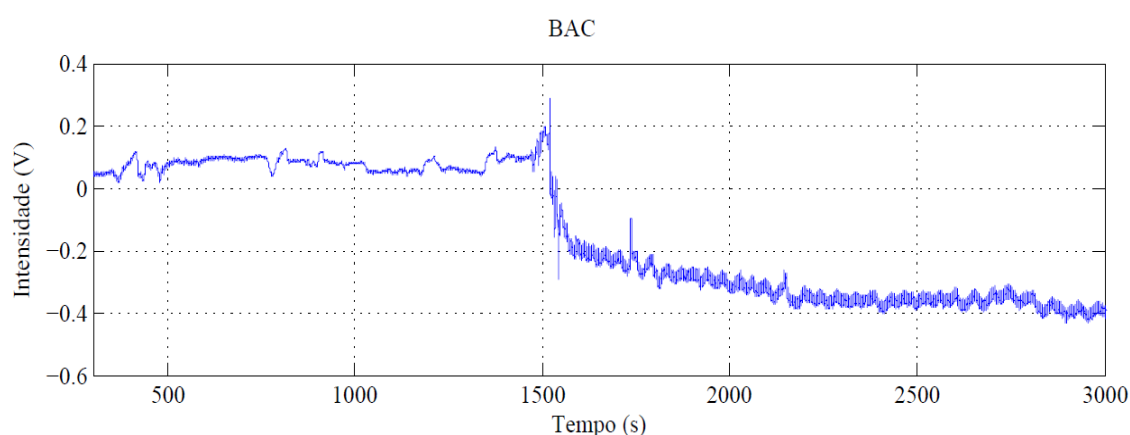


Figura 13: Exemplo de um sinal original obtido através da BAC.

A ocitocina é um hormônio natural que atua de forma a induzir a contração uterina com a finalidade de realização do parto (GUYTON e HALL, 2011). Para que ela obtenha êxito em sua função, ela depende da quantidade de receptores, intimamente acoplados à proteína G, presentes no miométrio. A quantidade de receptores é aumentada à medida que o parto se aproxima, produzindo assim contrações de frequência, duração e amplitude definida (GUYTON e HALL, 2011).

Este experimento foi realizado com a rata em estado não prenhe, então subentende-se que a quantidade de receptores de ocitocina, apesar de serem controlados pelos hormônios de reprodução, não aumentam significativamente durante a fase do ciclo ovulatório. Sendo assim, não há uma alteração significativa da frequência e da amplitude da contração uterina.

Assim como descrito na metodologia deste trabalho, além do controle positivo, foi realizado o controle negativo, através da aplicação de butilbrometo de escopolamina, tradicionalmente conhecido e comercializado como Buscopan®. A figura 14 apresenta um exemplo dos sinais obtidos para este caso.

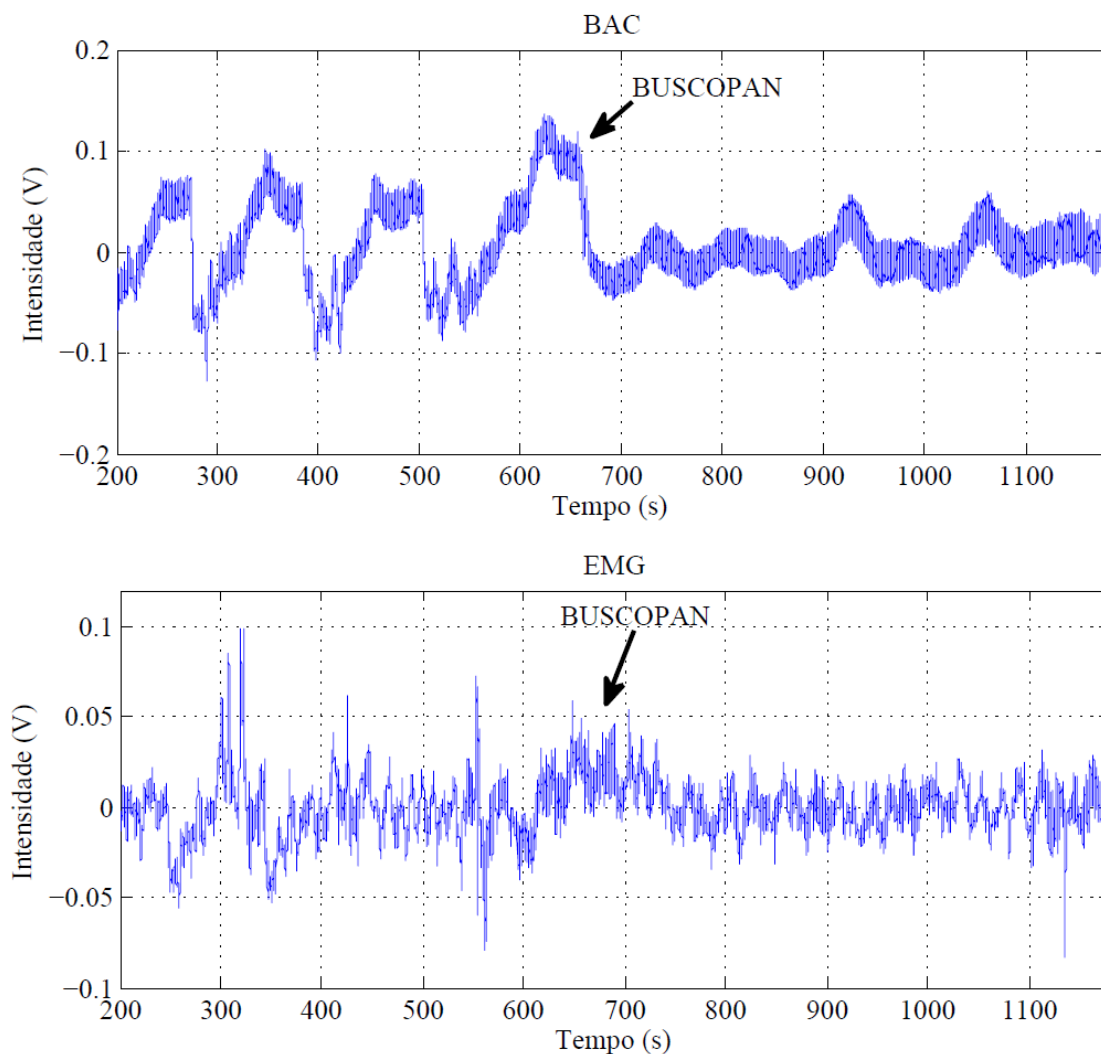


Figura 14: Exemplo de sinais com aplicação de butilbrometo de escopolamina. Contração mecânica (BAC) e elétrica (EMG).

Anteriormente à aplicação do fármaco, o sinal mecânico apresentado na figura 14 apresenta uma morfologia próxima ao padrão encontrado previamente. A quantificação da amplitude de contração mecânica tônica antes da aplicação do fármaco apresentou uma variação entre 0,032 e 0,14 V. Em termos de frequência, os sinais mecânicos apresentaram valores dentro da faixa obtida na primeira etapa do trabalho.

Após a aplicação do fármaco, no sinal mecânico, é possível observar uma nítida queda da amplitude da contração de baixa frequência, porém a amplitude da contração de alta frequência permanece a mesma. A amplitude pós administração de Buscopan® apresentou uma variação entre 0,02 e 0,1 V. O teste *t-Student* pareado mostrou que houve uma diferença significativa entre a contração mecânica antes e depois da aplicação, com valor de $p < 0,05$. A tabela 5 apresenta as médias e o desvio padrão das

amplitudes de contração mecânica e elétrica antes e depois da aplicação do fármaco. Através dela é possível constatar a queda da amplitude da contração mecânica.

Tabela 5: Médias obtidas antes e depois da administração do butilbrometo de escopolamina.

	Antes [V]	Depois [V]
BAC	$0,15 \pm 0,15^a$	$0,097 \pm 0,11^a$
EMG	$0,09 \pm 0,10^b$	$0,14 \pm 0,23^b$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão

^a $P < 0,05$ – Com diferença estatística significante.

^b $P > 0,05$ – Sem diferença estatística significante.

O sinal elétrico antes da aplicação do fármaco (figura 14), apesar de mais ruidoso, apresentou uma morfologia semelhante ao padrão encontrado, com os valores de frequência dentro da faixa previamente obtida para contração elétrica e com amplitudes variando entre 0,22 e 0,1 V. Após a aplicação do fármaco, a morfologia do sinal, bem como a frequência, não apresentaram diferença do controle. Os valores de amplitude variaram entre 0,03 e 0,11 V, e na tabela 5 observa-se um aumento dessa amplitude, ao invés da queda como era esperado. O teste *t-Student* pareado mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de amplitude antes e depois da aplicação do fármaco para este caso.

Sendo o butilbrometo de escopolamina um inibidor de prostaglandina, ele não interfere no processo de contração uterina, apenas bloqueia estes mediadores químicos que sinalizam a dor. A diminuição da amplitude na contração mecânica aguda possivelmente é o mecanismo utilizado pelo fármaco (através do sistema parassimpático) para inibir a prostaglandina. Isto explica a não alteração no sinal em termos de frequência de contração elétrica e mecânica, da amplitude de contração de alta frequência, e da amplitude do sinal elétrico. Além disto, isto é um indicativo de que o principal mecanismo de controle de frequência da contração uterina são os hormônios reprodutivos (estrógeno e progesterona).

5. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de contração uterina em ratas não prenhes utilizando a Biosusceptometria AC associada à Eletromiografia. Neste sentido, foi possível demonstrar através dos resultados obtidos, a eficiência do sistema BAC em promover uma análise da contração mecânica *in vivo* que, associada à técnica de EMG, permite uma análise completa e detalhada do processo de contração eletromecânico.

Obtidos os perfis de atividade elétrica e mecânica, foi possível correlacionar e localizar tanto qualitativamente (morfologia do sinal), quanto quantitativamente (faixas de frequências) o sinal elétrico com o sinal mecânico, mostrando as diferenças em que se manifestam. Isto é, o perfil mecânico se divide em picos intensos de baixa frequência e picos de baixa intensidade de alta frequência, enquanto que o elétrico, alterna entre sucessivos picos elétricos, que não caracterizam um potencial de ação gerador de contração, e manifestação de platôs com potenciais de ação para as contrações mecânicas intensas.

Em cada fase do ciclo estral, através da análise de frequências, conclui-se que, em ambos os sinais, não houve uma diferença morfológica (formato) no padrão de contração. Em termos de valores, foi observado também que não houve diferença significativa entre as fases do ciclo para os valores de baixa e alta frequência.

Utilizando os fármacos ocitocina e butilbrometo de escopolamina (Buscopan®), foi possível alterar o padrão normal de contração uterina e as técnicas foram capazes de quantificar e qualificar estas alterações em comparação com o padrão normal.

Para a aplicação de ocitocina, houve uma mudança na morfologia do sinal mecânico, uma vez que este se apresentou de maneira mais definida e provavelmente decorrente do acoplamento do movimento das camadas musculares do miométrio. Quanto à frequência, tanto no evento mecânico quanto no evento elétrico não registrou-se diferença relevante entre o antes e o depois da aplicação. A amplitude apresentou uma grande variabilidade com e sem administração da ocitocina e foi concluído que não houve diferença significativa entre o antes e o depois da aplicação do fármaco para ambos os eventos.

Na administração de butilbrometo de escopolamina não houve uma diferença na morfologia do sinal, visto que este permaneceu igual o sinal padrão. Na quantificação das frequências não houve uma alteração em relação ao padrão normal em ambos os eventos, elétrico e mecânico. Já para amplitude, mesmo esta não apresentando um padrão de manifestação, no evento mecânico houve uma diferença significativa, no qual a amplitude do sinal pós-administração do fármaco diminuiu em relação à amplitude do sinal sem administração. No evento elétrico não houve diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Sendo este trabalho um dos pioneiros na análise *in vivo* da contração uterina em ratas, e considerando escassez de informações a respeito deste processo em específico, este estudo apresenta uma alternativa para estudos relacionados ao processo de contração. Diferente das técnicas atualmente utilizadas, a Biosusceptometria AC é uma técnica com pouca invasividade, com baixo custo e sem a necessidade do sacrifício do animal, promovendo uma análise fisiológica mais próxima do real. Além das frequências, amplitudes e duração, juntamente com a Eletromiografia, o resultado apresenta o sinal como um todo, permitindo uma visualização completa dos parâmetros envolvidos em tempo real de medida. Este estudo poderá ser usado por outros pesquisadores que estudam doenças, fármacos, prenhez e diversos outros parâmetros que influenciam a atividade uterina em seu estado normal, contribuindo para uma melhoria na literatura já existente.

6. Referências bibliográficas

- AGOSTINHO, M. et al. Ac biosusceptometry as a method for measuring gastric contraction. **2010 Annual International Conference of the Ieee Engineering in Medicine and Biology Society (Embc)**, v. p. 5740-5743, 2010.
- AMERICO, M. F. et al. Validation of acb in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, p. 1340-4, e374, 2010a.
- AMERICO, M. F. et al. The acb technique: A biomagnetic tool for monitoring gastrointestinal contraction directly from smooth muscle in dogs. **Physiological Measurement**, v. 31, p. 159-169, 2010b.
- ANDREATINI, R. A importância dos modelos experimentais em psiquiatria. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 24, p. 2002.
- BAFFA, O. et al. Analysis and development of ac biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements. **Med Biol Eng Comput**, v. 33, p. 353-7, 1995.
- BATHGATE, R. A. D. et al. Relaxin family peptides and their receptors. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 405-480, 2013.
- COOPER, G.; SCHILLER, A. L. **Anatomy of the guinea pig**. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1975.
- CORA, A. et al. Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by ac biosusceptometry. **Physics in Medicine and Biology**, v. 50, p. 5523-5534, 2005a.
- CORA, L. A. et al. Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current biosusceptometry. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 413-20, 2003.
- CORA, L. A. et al. Influence of compression forces on tablets disintegration by ac biosusceptometry. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 372-9, 2008.
- CORA, L. A. et al. Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by ac biosusceptometry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 1-8, 2006a.
- CORA, L. A. et al. Enteric coated magnetic hpmc capsules evaluated in human gastrointestinal tract by ac biosusceptometry. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1809-16, 2006b.
- CORA, L. A. et al. Ac biosusceptometry in the study of drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, p. 1223-41, 2005b.
- CORA, L. A. et al. Ac biosusceptometry in the study of drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1223-1241, 2005c.
- DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
- ENOKE, R. M. **Bases neuromecânicas da cinesiologia**. São Paulo: Manole, 2000.
- ESCAMILLA, R. F. et al. Effects of technique variations on knee biomechanics during the squat and leg press. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, p. 1552-1566, 2001.
- ESWARAN, H. et al. Application of wavelet transform to uterine electromyographic signals recorded using abdominal surface electrodes. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 11, p. 158-66, 2002.
- GARFIELD, R. E.; MANER, W. L. Physiology and electrical activity of uterine contractions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 289-295, 2007.
- GOUVEA JR, A. et al. The effects of diazepam on the elevated t-maze are dependent on the estrous cycle of rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, p. 227-233, 2009.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HURD, W. W. et al. Cocaine augments contractility of the pregnant human uterus by both adrenergic and nonadrenergic mechanisms. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, p. 1077-81, 1998.

- KAO, C. Y. Long-term observations of spontaneous electrical activity of the uterine smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 196, p. 343-50, 1959.
- KARLSSON, S.; GERDLE, B. Mean frequency and signal amplitude of the surface emg of the quadriceps muscles increase with increasing torque - a study using the continuous wavelet transform. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 11, p. 131-140, 2001.
- KUNZEL, J. et al. Myometrial response to neurotropic and muscletropic spasmolytic drugs in an extracorporeal perfusion model of swine uteri. **Reprod Biomed Online**, v. 23, p. 132-40, 2011.
- LECARPENTIER, E. R. et al. Mechanics and energetics of myosin molecular motors from nonpregnant human myometrium. **Journal of Applied Physiology**, v. 111, p. 1096-1105, 2011.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, p. 609-14, 2002.
- MARTINS, L. L. et al. Morphology of the uterus of nulliparous and non nulliparous agoutis. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 63, p. 326-332, 2011.
- MATTHEW, A.; SHMYGOL, A.; WRAY, S. Ca²⁺ entry, efflux and release in smooth muscle. **Biol Res**, v. 37, p. 617-24, 2004.
- MIRANDA, J. R. et al. An ac-biosusceptometer to study gastric-emptying. **Medical Physics**, v. 19, p. 445-448, 1992.
- MIRANDA, J. R. et al. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, p. 1791-9, 1997.
- MORAES, R. et al. Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of ac biosusceptometry. **Physiological Measurement**, v. 24, p. 337-45, 2003.
- MOSLEM, B. et al. Energy distribution analysis of uterine electromyography signals. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 30, p. 361-365, 2010.
- MUNGLUE, P. et al. The effects of watermelon (citrullus lanatus) extracts and l-citrulline on rat uterine contractility. **Reprod Sci**, v. 20, p. 437-48, 2013.
- NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- NEWMAN, R. B. Uterine contraction assessment. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 32, p. 341-+, 2005.
- PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A. Excitability in uterine smooth muscle. **Front Horm Res**, v. 27, p. 179-200, 2001.
- PHELPS, L. E.; PEULER, J. D. Evidence of direct smooth muscle relaxant effects of the fibrate gemfibrozil. **J Smooth Muscle Res**, v. 46, p. 125-42, 2010.
- RABOTTI, C. et al. Estimation of internal uterine pressure by joint amplitude and frequency analysis of electrohysterographic signals. **Physiological Measurement**, v. 29, p. 829-841, 2008.
- SHAFIK, A. Electrohysterogram: Study of the electromechanical activity of the uterus in humans. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 73, p. 85-89, 1997.
- SHEW, R. L.; PAPKA, R. E.; MCNEILL, D. L. Calcitonin gene-related peptide in the rat uterus: Presence in nerves and effects on uterine contraction. **Peptides**, v. 11, p. 583-9, 1990.
- SHEW, R. L.; PAPKA, R. E.; MCNEILL, D. L. Galanin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in nerves of the rat uterus: Localization, colocalization, and effects on uterine contractility. **Peptides**, v. 13, p. 273-9, 1992.
- SMITH, J. G.; MERRILL, D. C. Oxytocin for induction of labor. **Clin Obstet Gynecol**, v. 49, p. 594-608, 2006.
- STENSDOTTER, A. K. et al. Quadriceps activation in closed and in open kinetic chain exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, p. 2043-2047, 2003.
- WEI, S. Q. et al. High-dose vs low-dose oxytocin for labor augmentation: A systematic review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 203, p. 296-304, 2010.

- WIKLAND, M.; LINDBLOM, B. Relationship between electrical and mechanical activity of the isolated term-pregnant human myometrium. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 20, p. 337-346, 1985.
- WONG, C. W.; O, W. S.; TANG, F. Intermedin in rat uterus: Changes in gene expression and peptide levels across the estrous cycle and its effects on uterine contraction. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, p. 13, 2013.