Liege Cristina Garcia da Silva

*Aplicação preventiva do surfactante
porcino (Instituto Butantan®) intra-
traqueal no desempenho clínico e
pulmonar de neonatos ovínos prematuros.*

São Paulo

2012

LIEGE CRISTINA GARCIA DA SILVA

Aplicação preventiva do surfactante porcino (Instituto Butantan[®]) intra-traqueal no desempenho clínico e pulmonar de neonatos ovinos prematuros.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi

**São Paulo
2012**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2592
FMVZ

Silva, Uege Cristina Garcia da
Aplicação preventiva do surfactante porcino (Instituto Butantan®) intra-
traqueal no desempenho clínico e pulmonar de neonatos ovinos prematuros /
Uege Cristina Garcia da Silva. – 2012.
130 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. São Paulo,
2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Camila Infantes Vannucchi.

1. Ventilação. 2. Hemogasometria. 3. Estresse oxidativo. 4. Pulmão. 5. Rato-X.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso clínico do surfactante para a função pulmonar de neonatos ovinos pré-termos", protocolado sob o nº 2039/2010, utilizando 24 (vinte e quatro) ovelhas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 08/12/2010.

We certify that the Research "Clinical use of surfactant to the lung function of preterm lambs", protocol number 2039/2010, utilizing 24 (twenty-four) sheep, under the responsibility Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/08/2010.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Liege Cristina Garcia da

Título: **Aplicação preventiva do surfactante porcino (Instituto Butantan[®]) intra-traqueal no desempenho clínico e pulmonar de neonatos ovinos prematuros**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A Deus, pelo milagre da vida e o ensejo de
enxergá-la pura e bela*

*Aos meus queridos pais, avô, irmão e ao Gui.
Presentes da minha vida,
todo o meu amor.*

AGRADECIMENTOS

“Mas você – eu não posso e nem quero explicar, eu agradeço.”

CLARISSE LISPECTOR

Pai e mãe, a razão de tudo em minha vida são vocês. Vocês merecem toda a glória deste trabalho! Muito obrigada por todo zelo, esforço e amor incondicional que me dedicam desde que eu era a Lilica Repilica... Vocês, juntamente com o vovô e o Tiago, são meu alicerce e meus exemplos de vida! Amo muito todos vocês!

Gui, até hoje me surpreendo com a capacidade de amar que você tem! Acho isso lindo! Você vai além do meu namorado “puxa-saco”, é meu amigo, companheiro para qualquer hora! Eu te amo muito e espero passar longos e longos anos ao seu lado!

“Já não sei andar só pelos caminhos, porque já não posso andar só.”

FERNANDO PESSOA

Dentre tudo que minha orientadora, prof. Dra. Camila I. Vannucchi pode me ensinar ao longo dos anos, talvez a mais preciosa das lições, tenha sido a de que, por mais qualificados que sejamos, um trabalho em equipe sempre superará o brilho individual. Muito obrigada, Cá, por ter sido minha orientadora em todos os momentos, por ter tentado extrair o meu potencial máximo e por ter me permitido participar de um grupo tão brilhante como o nosso! Espero de todo o coração, ter feito jus a ele! Aos meus queridos amigos de grupo, a minha mais sincera gratidão! Vocês, inúmeras vezes, foram minhas mãos, meus olhos, minhas horas de sono... !! Cris e Fe (zinha), minhas amigas acima de qualquer coisa, muito obrigada por toda preocupação e carinho, sempre!! Gi e Dani, meus melhores companheiros de ovelhas, obrigada por cada minuto especial que passei com vocês! À prof. Dra. Cláudia B. Fernandes, minha “co-orientadora de coração” e membro honorário do grupo da prof. Camila, obrigada por ter sido tão generosa e solícita, eu nunca me esquecerei! Ao final, resta-me a deliciosa certeza que sem vocês todos, eu não conseguiria. E, ainda bem, que os tenho!

“Amigos são a outra parte do oceano que a gota procura”

ÉRICO VERÍSSIMO

Minhas amigas-irmãs de toda a vida, Anna, Carol e Tata; minha doidinha Giulianna; minhas amigas veterinárias, Lajota, Débora, Jaqueline e todas as incríveis; minha mais

recente aquisição Camila (Camilita!); meu amigo Rodrigo peixe boi (companheiro de Grey..) e todos os demais amigos que preenchem meu coração, MIL VEZES MUITO OBRIGADA!! São vocês os responsáveis pela minha vida ser mais leve!! Todo o meu amor e admiração!!!

“Quanto aos homens, não é o que eles são que me interessa, mas o que eles podem se tornar”

JEAN-PAUL SARTRE

Considero-me uma pessoa privilegiada em muitos sentidos e, indubitavelmente, fazer parte da FMVZ-USP há 11 anos e, em especial, do VRA, há 7 anos me traz este sentimento. Agradeço profundamente todos os amigos e colegas pós-graduandos. Lisonjeia-me enxergar a evolução pessoal e profissional de cada um! De boas árvores, colhem-se bons frutos!

Gostaria de agradecer, em especial, aos professores do VRA, dentre eles Mayra e Visintin, por sempre colaborarem com nossa equipe, abrindo as portas do seu laboratório, à prof. Dra. Valquíria H. Barnabe e ao Dr. Marcílio Nichi, por toda colaboração na análise do estresse oxidativo. Muito obrigada, Marcílio, pelas incontáveis vezes que você me salvou, pelas análises estatísticas, pelas berinjelas nos churrascos! Agradeço, ainda, à prof. Dra. Maria Cláudia Sucupira (VCM), por toda a gentileza e solicitude; ao prof. Dr. Fernando J. Benesi (VCM), por ter nos sedido as ovelhas, além do carinho e atenção dedicados; ao M.V. Marcelo Faustino, pela amizade, frascos contrabandeados, risadas; à M.V. Silvana Unruh (HOVET), pela contribuição na análise radiográfica, à química Clara (HOVET), por me ajudar a entender os tais antioxidantes; à M.V. Juliana Monteiro e ao M.V. Renato Zonzini, pelas avaliações de uréia de creatinina; ao pós-graduando Alessandro (VCI) e à prof. Dra. Aline Ambrósio (VCI), pela vibrante ajuda na tentativa de ventilar nossos cordeiros, tenho certeza que em breve conseguiremos! Também agradeço aos professores Dr. Wilson R. Fernandes e Dra. Carla Belli (VCM), pelo empréstimo do aparelho de lactato e, especialmente, o prof. Dr. Fábio Pogliani (VCM), por todo o cuidado com nossas ovelhas mães e bebês!! Ademais, agradeço ao M.V. Gabriel Miranda e à empresa Virbac, pela doação do medicamento Alizin®.

Por fim, porém não menos especial, agradeço minha ovelhas, por toda docilidade! Banana, Manteiga e Deola, minhas sapecas, vocês são a prova de que, por mais longo que o caminho seja, nós já demos um passo!

*“Os ideais que iluminaram meu caminho
são a bondade, a beleza
e a verdade”*

Albert Einstein

*“É fácil entender a verdade quando ela é
descoberta, o difícil é descobri-la”*

Galileu Galilei

RESUMO

SILVA, L. C. G. **Aplicação preventiva do surfactante porcino (Instituto Butantan[®]) intra-traqueal no desempenho clínico e pulmonar de neonatos ovinos prematuros.** [Preventive application of intra-tracheal porcine surfactant (Butantan Institute[®]) for clinic and pulmonary performance of preterm lambs]. 2012. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Em Medicina Veterinária, o uso do surfactante como conduta assistencial em neonatos pré-termos ainda é um desafio. Destarte, foram objetivos deste estudo: avaliar a terapia com surfactante porcino intra-traqueal, correlacionando-a com a evolução de neonatos ovinos prematuros. Para tal, agruparam-se os neonatos nos grupos Ventilação (VEN; n = 5), Surfactante-1 aplicação (SURF1; n = 5), Surfactante-2 aplicações (SURF2; n = 6) e Surfactante-3 aplicações (SURF3, n = 6). Ao nascimento todos os neonatos foram intubados e ventilados com balão auto-inflável durante 2 horas. Para os grupos SURF 1, 2 e 3, instilou-se pela via traqueal 100 mg/kg PV de surfactante porcino e colheu-se amostras nos seguintes momentos: exame clínico pelo escore Apgar, temperatura retal e oximetria de pulso aos minutos 0, 5, a cada 10 minutos até 1,5h, 2, 4, 6 e 24h, radiografia torácica às 0 e 24 h, hemogasometria arterial, concentração sérica de enzimas antioxidantes (catalase-CAT, superóxido dismutase-SOD e glutathione peroxidase-GPx) e marcador do estresse oxidativo (TBARS); glicemia, lactatemia, uréia e creatinina séricas às 0, 2, 4, 6 e 24 h. Para a avaliação histopatológica pulmonar, incluiu-se o grupo CON (n = 3), formado por animais da mesma idade gestacional, não ventilados e sem acesso ao surfactante. No líquido amniótico, colhido intra-parto, foi avaliada a concentração de TBARS, SOD e GPx. Como resultados, houve maior sobrevivência para o grupo VEN, em relação aos SURF1 e 3. Neonatos VEN apresentaram melhor evolução clínica, com notas Apgar, frequência cardíaca (FC), padrão respiratório (PR) e oximetria de pulso superiores aos demais. Todos os grupos apresentaram uremia e hiperlactatemia no primeiro dia de vida, com valores de lactato sérico significativamente superiores para SURF1. Na avaliação hemogasométrica, houve acidose para o grupo SURF1, hipoxemia e hipercapnia para todos os grupos, com valores de pO₂ significativamente inferiores para SURF1, em relação ao VEN. Na

avaliação do LA, não houve diferença entre os valores de TBARS, SOD e GPx entre os grupos. Todavia, na avaliação sanguínea, SOD e CAT correlacionaram-se com oximetria de pulso e GPx com lactato sérico. A avaliação histopatológica pulmonar evidenciou edema, congestão, atelectasia para todos os grupos, presença de monócitos mais evidente nos grupos SURF2 e 3 em relação ao VEN e CON; maior aporte de neutrófilos para o grupo SURF3 em relação ao VEN e CON e espessamento de parede mais evidente em VEN, SURF2 e 3, em comparação ao CON. Em conclusão, a terapia com surfactante intra-traqueal associada à ventilação manual acarretou menor vitalidade clínica e desempenho respiratório em cordeiros prematuros; foi determinado o perfil oxidativo no LA de fetos aos 135 dias de gestação, bem como, o grau de estresse oxidativo neonatal; a ventilação manual com balão auto-inflável, associada ou não à terapia com surfactante intra-traqueal, induziu alterações estruturais e inflamatórias no parênquima pulmonar neonatal; e, por fim, o protocolo terapêutico proposto a ovinos prematuros, com o desígnio de manter a adequada função respiratória e asseverar a sobrevivência neonatal mostrou-se pouco satisfatório em virtude da elevada mortalidade neonatal.

Palavras-chave: Ventilação. Hemogasometria. Estresse oxidativo. Pulmão. Raio-X.

ABSTRACT

SILVA, L. C. G. **Preventive application of intra-tracheal porcine surfactant (Butantan Institute®) for clinic and pulmonary performance of preterm lambs.** [Aplicação preventiva do surfactante porcino (Instituto Butantan®) intra-traqueal no desempenho clínico pulmonar de neonatos ovinos prematuros]. 2012. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In veterinary medicine, the implement of surfactant therapy for preterm newborns is still a challenge. Thus, the aims of this study were: to evaluate the porcine surfactant intra-tracheal therapy, correlating with the overall evolution of preterm. Newborns were randomly allocated in groups: ventilation (VEN, n = 5), surfactant-1 application (SURF1, n = 5), surfactant-2 application (SURF2, n = 6) and surfactant-3 application (SURF3, n = 6). At birth, all neonates were tracheally intubated and ventilated with self-inflating bag for 2 hours. SURF1, 2 and 3 newborns were tracheally instilled with 100 mg/kg BW of porcine surfactant and samples were collected at the following times: clinical examination through the Apgar score, rectal temperature and pulse oximetry at birth, 5min, every 10 min, until 1,5h, 2, 4, 6 and 24h; chest radiography at 0 and 24 h; arterial blood gas analysis, serum TBARS, CAT, SOD and GPx, glucose, blood lactate, urea and serum creatinine at 0, 2, 4, 6 and 24 h. For histopathological evaluation, a control group was included (CON, n = 3), constituted by animals of the same gestational age, non-ventilated and without access to the surfactant therapy. Amniotic fluid was collected during delivery and analysed for TBARS, SOD and GPx concentrations. Results demonstrated higher survival rate for VEN group, in relation to SURF1 and 3. VEN neonates showed better clinical outcome, with superior Apgar scores, HR, RP and pulse oximetry. All groups had uremia and hyperlactatemia, with serum lactate values significantly higher for SURF1. At hemogasometric evaluation, SURF1 group presented acidosis; all groups had hypercapnia and hypoxemia, with significantly lower values of pO₂ for SURF1 group in relation to the VEN. Amniotic fluid evaluation showed no difference among groups for TBARS, SOD and GPx values. However, in blood analysis, SOD and CAT were correlated with pulse oximetry and GPx with serum lactate. Histopathology showed pulmonary edema, congestion, atelectasis for all groups. Monocytes were more evident in groups

SURF2 and 3 compared to VEN and CON. Neutrophils were higher in SURF3 group compared to VEN and CON. Also, VEN, SURF2 and 3 groups presented more evident wall thickness compared to CON lambs. In conclusion, intra-tracheal surfactant therapy associated with manual ventilation leads to lower clinical vitality and respiratory performance in preterm lambs; AF oxidative profile was determined for ovine fetuses at 135 days of gestation, as well as the degree of neonatal oxidative stress; manual ventilation with self-inflating bag, with or without surfactant therapy induced inflammatory and structural changes in neonatal lung parenchyma; and finally, the therapeutic protocol proposed to preterm sheep, aiming to maintain adequate respiratory function and to assure neonatal survival was unsatisfactory due to the high neonatal mortality.

Key-words: Ventilation. Hemogasometry. Oxidative stress. Lung, X-ray.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Parâmetros adotados para o escore Apgar de vitalidade neonatal.....	51
Quadro 2 - Valores de referência adotados para as variáveis estudadas no período entre o nascimento e os 7 dias de vida de neonatos ovinos - São Paulo - 2012	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamentos utilizados na assistência neonatal. A: Balão auto-inflável neonatal humano tipo Ambu (Oxigel [®]), de 250 mL de volume, válvula de segurança limitada a 40 ± 05 cm H ₂ O e com manômetro de pressão acoplado. B: Material para intubação traqueal e instilação do surfactante, contendo laringoscópio acoplado à lâmina (Oxigel [®]), cânula de intubação com cuff (Solidor [®]), conector plástico e sonda uretral (Mark Med [®]) C: neonato em berço aquecido, intubado e ventilado.....	46
Figura 2 - Escore Apgar médio (média $\pm$ DP) nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3), entre 0 e 24 horas após o nascimento.....	67
Figura 3 - Temperatura corpórea média nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3); aos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas após o nascimento.....	68
Figura 4 - Irritabilidade reflexa média nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3); aos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas após o nascimento.....	70
Figura 5 - Oximetria de pulso média (%) nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3), entre 0 e 24 horas após o nascimento.....	71
Figura 6 - Grau de opacidade do parênquima pulmonar às avaliações radiográficas látero-laterais direita e esquerda em cordeiros prematuros, imediatamente ao nascimento.....	79
Figura 7 - Grau de visibilização da silhueta cardíaca às avaliações radiográficas látero-laterais direita e esquerda em cordeiros prematuros, imediatamente ao nascimento.....	79
Figura 8 - Imagens radiográficas torácicas de neonatos ovinos prematuros, imediatamente ao nascimento. A- projeção LLD: indefinição de silhueta cardíaca e bordo diafragmático, aumento de radiopacidade intenso e generalização, não visibilização de ramificação brônquica. B- projeção LLE:	

	parcial definição de silhueta cardíaca, completa definição de bordo diafragmático, aumento de radiopacidade moderado, localizado em lobos caudais, presença evidente de broncogramas aéreos.....	80
Figura 9 -	Imagens radiográficas torácicas de neonatos ovinos prematuros, 24 horas após o nascimento. A- projeção LLE: padrão pulmonar intersticial e discreta opacificação do parênquima tecidual, definição da silhueta cardíaca e bordos diafragmáticos B- projeção LLD: parcial definição de silhueta cardíaca e bordo diafragmático, aumento de radiopacidade intenso, com parênquima heterogêneo e alguns broncogramas aéreos.....	80
Figura 10 -	Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, nascidos aos 135 dias de gestação coradas em HE A- 10X, expansão irregular do parênquima, com áreas de atelectasia e expansão alveolar separadas por septo (seta). B- 20X, presença de alvéolos expandidos (a) e compactados (ac), sáculo e parede inter-sacular (seta).....	82
Figura 11 -	Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, pertencentes ao grupo VEN coradas em HE. A- áreas de hiperexpansão alveolar e ductal e ainda, enfisema alveolar (seta) em lobo cranial. B- discreta distensão do parênquima pulmonar em lobo caudal.....	82
Figura 12 -	Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, nascidos aos 135 dias de gestação coradas em HE. A- lobo cranial com edema difuso e moderado (e), expansão alveolar irregular e congestão (seta). B- presença de distensão septal com conteúdo fibrinoso (f) e vasos congestos (setas) pelo parênquima.....	83
Figura 13 -	Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, nascidos aos 135 dias de gestação coradas em HE. A- reação inflamatória intensa, com infiltrado neutrofílico em bronquíolos e alvéolos B- presença de conteúdo fibrinoso em alvéolos e moderada quantidade de células inflamatórias dispersas pelo parênquima.....	83
Figura 14 -	Fotomicrografias de pulmão de neonato neonato pertencente ao grupo SURF3 coradas em HE. A- reação inflamatória intensa, com infiltrado neutrofílico em bronquíolos e alvéolos B- presença de colônia bacteriana em parênquima pulmonar (seta).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais Grupos (SURF1 vs. SURF2 vs. SURF3 vs VEN) e Momentos de avaliação (0 vs. 5 vs. 10 vs. 20 vs. 30 vs. 40 vs. 50 vs. 60 vs. 70 vs. 80 vs. 90 min vs. 2 vs. 4 vs. 6 vs. 24h) e sua interação para a avaliação clínica neonatal - São Paulo - 2012.....	65
Tabela 2 -	Composição dos grupos experimentais VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 com relação ao gênero e ao tempo de sobrevivência em horas (média ± DP) dos neonatos - São Paulo - 2012.....	66
Tabela 3 -	Média e desvios padrão da FC (bpm), FR (mrm), nota da FR (0 a 2) e nota do padrão respiratório (0 a 2) dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, ao longo das primeiras 24 horas do nascimento. - São Paulo - 2012.....	69
Tabela 4 -	Média e desvios padrão da concentração sérica de lactato (mmol/L) dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, às 0, 2, 4, 6 e 24 horas do nascimento. - São Paulo - 2012.....	72
Tabela 5 -	Média e desvios padrão das variáveis séricas glicemia (mg/dL), uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL), dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, ao longo das primeiras 24 horas do nascimento. - São Paulo - 2012.....	73
Tabela 6 -	Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais Grupos (SURF1 vs. SURF2 vs. SURF3 vs VEN) e Momentos de avaliação (0 vs. 2 vs. 4 vs. 6 vs. 24h) e sua interação para a avaliação hemogasométrica neonatal - São Paulo - 2012.....	74
Tabela 7 -	Média e desvios padrão das variáveis hemogasométricas pH, pO ₂ (mmHg), pCO ₂ (mmHg), TCO ₂ (mmol/L), HCO ₃ ⁻ (mmol/L), BE (mmol/L) e SpO ₂ (%), dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, ao longo das primeiras 24 horas do nascimento. - São Paulo - 2012.....	75
Tabela 8 -	Média e desvios padrão das concentrações plasmáticas dos íons Na ⁺ (mmol/L) e K ⁺ (mmol/L), dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, ao longo das primeiras 24 horas do nascimento. - São Paulo - 2012.....	76
Tabela 9 -	Média e desvios padrão das concentrações de TBARS, glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) no líquido amniótico (LA) dos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3. - São Paulo - 2012.....	77
Tabela 10 -	Média e desvios padrão das concentrações de TBARS em soro, glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) na papa de hemácias de	

	neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3. - São Paulo - 2012.....	78
Tabela 11 -	Avaliação histopatológica em lobo pulmonar caudal direito dos grupos CON, VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, para as seguintes variáveis presença de monócitos teciduais, grau de expansão do parênquima pulmonar, presença de neutrófilos e grau de espessamento da parede alveolar, classificadas de 0 a 4, conforme intensidade de ocorrência. - São Paulo - 2012....	81
Tabela 12 -	Coeficiente de correlação e de significância das variáveis tempo de vida, escore Apgar, FC, PR, TM, IR, temperatura corpórea (Temp), oximetria (Oxi), lactato sérico, pH, pCO ₂ , pO ₂ , HCO ₃ ⁻ , BE, SO ₂ , para todos os neonatos estudados. - São Paulo - 2012.....	86
Tabela 13 -	Coeficiente de correlação e de significância das variáveis escore Apgar, pH, oximetria de pulso (oximetria), lactato sérico, TBARS, GPx, SOD e CAT. – São Paulo – 2012.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
AL	Alvéolo
Apgar	Escore de vitalidade Apgar
BE	<i>Base Excess</i> - Base-tampão total
BR	Bronquíolo respiratório
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CON	Grupo controle
CPAP	Pressão das vias aéreas contínua e positiva
dg	Decigrama
DP	Desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ⁺	Íon hidrogênio
Hb	Hemoglobina
Hb[O ₂]	Oxi-hemoglobina

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
HE	Hematoxilina-eosina
Ht	Hematócrito
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IM	Intra-muscular
IR	Irritabilidade reflexa
K ⁺	Íon potássio
kg	Quilograma
kV	Quilowatts
LA	Líquido amniótico
MDA	malondialdeído
mg	Miligrama
mEq/L	Miliequivalente por litro
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mrpm	Movimentos respiratórios por minuto
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
ng	Nanograma
Na ⁺	Íon sódio
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila

Oxi	Oximetria de pulso (%)
PA	Pressão arterial não-invasiva
PEEP	Pressão final expiratória positiva
PIP	Pico de pressão inspiratória
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PR	Padrão respiratório
RNPT	Recém-nascido pré-termo
RX	Raio X
SC	Sub-cutâneo (a)
SDR	Síndrome do desconforto respiratório
SpO ₂	Saturação de oxigênio em hemogasometria arterial
SO ₂	Saturação de oxigênio em oximetria de pulso
SOD	Superóxido dismutase
SP-A	Proteína A do surfactante
SP-B	Proteína B do surfactante
SP-C	Proteína C do surfactante
SP-D	Proteína D do surfactante
SURF	Grupo surfactante
TBA	Ácido tiobarbitúrico
tBPH	t-butilhidroxiperoxido
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCO ₂	Dióxido de carbono total

Temp	Temperatura corpórea em graus Celsius
TM	Tônus muscular
U	Unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de terapia intensiva
VEN	Grupo ventilação sem surfactante

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior
®	Marca Registrada
<	Menor
≤	Menor ou igual
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 HIPÓTESE.....	30
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	32
2.1 O DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO.....	32
2.2 O SISTEMA SURFACTANTE FETO-NEONATAL.....	34
2.2.1 Terapia de reposição de surfactante em neonatos.....	36
2.3 O SISTEMA ANTIOXIDANTE FETO-NEONATAL.....	39
2.4 ASSISTÊNCIA VENTILATÓRIA NEONATAL.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
3.2 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO LÍQUIDO AMNIÓTICO.....	47
3.2.1 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	47
3.2.2 Quantificação da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx).....	48
3.2.3 Quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)...	49
3.3 AVALIAÇÕES NEONATAIS.....	50
3.3.1 Avaliação clínica.....	50
3.3.2 Hemogasometria arterial.....	52
3.3.3 Avaliação da glicemia e lactato sanguíneos.....	53
3.3.4 Avaliação das concentrações de uréia e creatinina séricas.....	54

3.3.5 Avaliação do sistema antioxidante neonatal.....	54
3.3.5.1 <i>Confecção da papa de hemácias e do lisado de papa de hemácias.....</i>	55
3.3.5.2 <i>Quantificação da concentração de hemoglobina (Hb) na amostra.....</i>	55
3.3.5.3 <i>Quantificação da enzima antioxidante catalase (CAT) nos eritrócitos.....</i>	56
3.3.5.4 <i>Quantificação das enzimas antioxidantes SOD e GPx nos eritrócitos.....</i>	57
3.3.6 Avaliação radiográfica torácica neonatal.....	57
3.3.7 Oximetria de pulso.....	58
3.3.8 Avaliação histopatológica dos pulmões.....	60
3.4 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES.....	61
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
3.6 VALORES DE REFERÊNCIA.....	63
 4 RESULTADOS	65
4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	66
4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	67
4.3 AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA ARTERIAL.....	73
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO NEONATAL.....	76
4.4.1 Quantificação de TBARS, GPx e SOD no LA.....	76
4.4.2 Quantificação das TBARS no soro e das enzimas CAT, GPx e SOD na papa de hemácias.....	77
4.5 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PULMONAR.....	78
4.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES.....	81
4.7 TESTES DE CORRELAÇÃO.....	84

5 DISCUSSÃO.....	89
5.1 SOBREVIDA E VITALIDADE NEONATAL.....	89
5.2 OXIMETRIA DE PULSO NEONATAL.....	93
5.3 GLICEMIA, LACTATEMIA E FUNÇÃO RENAL.....	94
5.4 EQUILÍBBRIO ÁCIDO-BÁSICO NEONATAL.....	97
5.5 PERFIL OXIDATIVO PERINATAL.....	99
5.6 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PULMONAR.....	101
5.7 HISTOPATOLOGIA PULMONAR.....	103
6 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXOS.....	129

Introdução

.....

1 INTRODUÇÃO

No desempenho da Medicina Veterinária, a Neonatologia figura como uma recente especialização. Por este motivo, os estudos relativos à fisiologia e assistência neonatal nas diversas espécies ainda são escassos, o que contribui para o baixo grau de treinamento técnico e ineficiência da monitorização e reanimação neonatal usualmente praticadas. Como consequência, os índices de morbimortalidade reportados são elevados e quando da abordagem de um paciente prematuro, sua reanimação e assistência tornam-se ainda mais desafiadoras e o sucesso terapêutico mantém-se como um objetivo longínquo.

Diversas particularidades fisiológicas do neonato justificam a singularidade deste breve período da vida. Citam-se a adaptação termorregulatória, o aprimoramento das funções hepática e renal, assim como, a completa maturação nervosa. Todavia, é possível destacar a capacidade de iniciar a respiração pulmonar em substituição à atividade placentária na obtenção de oxigênio, como condição precípua e indispensável ao êxito neonatal. E, para tal, a adequada função respiratória, incluindo a maturação morfológica, fisiológica e bioquímica dos pulmões, faz-se necessária.

Os distúrbios respiratórios são os mais frequentes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) neonatais humanas, presentes em recém-nascidos pré-termo, termo e pós-termo. Dentre os problemas de origem pulmonar descritos em Medicina, a Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) do recém-nascido é a de maior importância clínica e epidemiológica (MIYOSHI; GUINSBURG; KOPELMAN, 1998). Em 1972, Gluck et al. a definiram como uma consequência ao incompleto desenvolvimento neonatal, sobrevivendo em resposta à deficiência da produção de surfactante pulmonar, particularmente relacionada a indivíduos pré-termos. Nestes últimos, há o aumento da tensão superficial dos alvéolos pulmonares e a pressão necessária para mantê-los abertos eleva-se. Em sequência, há atelectasia alveolar progressiva, *shunt* intrapulmonar, anormalidades de ventilação/perfusão e distúrbios ácido-básicos, que culminam em grave disfunção respiratória (ADAS; ALBUQUERQUE; ZUCCHI, 2005). Em Medicina, o tratamento da SDR possui como objetivo fundamental, conservar a oxigenação e ventilação adequadas por uso de

.....

medidas profiláticas e terapêuticas, tais como a administração de surfactante exógeno, a assistência ventilatória e a oxigenoterapia.

A habilidade do surfactante em reduzir a tensão superficial e elevar a complacência pulmonar foi primeiramente descoberta por Kurt von Neergaard, há aproximadamente um século, em 1929. Seguindo-se algumas décadas, os pesquisadores Pattle (1955) e Clements (1957) aprofundaram os conhecimentos deste complexo mecanismo de ação. Todavia, somente a partir da década de 1990, a terapia de reposição do surfactante a neonatos portadores da SDR foi instituída com sucesso em Medicina, diminuindo a incidência de morte, pneumotórax e hemorragia intra-ventricular (HALLIDAY, 2006).

O estudo da ventilação pulmonar artificial tem sido relatado em Medicina Humana há vários séculos. Hipócrates (460 a 377 a.C.) foi o primeiro cientista a investigar e aduzir sua experiência com a intubação endotraqueal, contudo, somente a partir do século XIX intensificaram-se as pesquisas sobre a ventilação na reanimação neonatal (TANAKA; IMPERIAL, 2005). A situação clínica mais comum para o suporte ventilatório a neonatos é a SDR. Entretanto, estudos em Medicina Humana, sustentam a idéia de que modos de ventilação indutores da hiperexpansão e/ou colapso alveolar repetido conduzem a distúrbios na integridade da membrana alvéolo-capilar e comprometimento do sistema surfactante (VERBRUGGE; LACHMANN, 1999).

A administração de oxigênio como estratégia terapêutica no combate à hipoxemia deve ser realizada com circunspecção. Recém-nascidos são propriamente suscetíveis ao estresse oxidativo, por desbalanço entre sistemas pró e antioxidantes. Desta maneira, a produção de radicais livres de oxigênio ultrapassa seu combate e tal excesso é responsável pela injúria molecular e celular a diferentes tecidos do organismo, em especial o cerebral e pulmonar (GITTO; REITER; KARBOWNIK, 2002). Durante a transição feto-neonatal, o recém-nascido é exposto a um ambiente muito mais rico em oxigênio, causando um desafio oxidativo ao neonato. Tal cenário pode ser ainda mais tóxico em pacientes prematuros (BUONOCORE; GROENENDAAL, 2007).

Em ovinos, estima-se que a mortalidade neonatal, nas primeiras semanas pós-natal, seja superior a 15% (DWYER; MORGAN, 2006) e alcance o elevado índice de 35% ao longo dos primeiros 6 meses de vida (NASH et al., 1996). Todavia,

.....

a espécie ovina tem sido vastamente adotada como modelo experimental para humanos, portanto, os estudos realizados não possuem a intenção precípua de aprimorar a assistência aos neonatos ovinos. Sendo assim, o delineamento de condutas terapêuticas e corretivas tem sido negligenciado.

Em face do exposto, delinearam-se os seguintes objetivos para o presente estudo:

1) Avaliar os efeitos do surfactante exógeno porcino administrado por via intra-traqueal, associado à ventilação manual com balão auto-inflável para cordeiros pré-termos;

2) Correlacionar o exame clínico geral, radiografia torácica e hemogasometria arterial com a saturação de oxigênio neonatal em ovinos prematuros, submetidos ou não ao tratamento com surfactante no período pós-nascimento imediato;

3) Verificar o grau de estresse oxidativo e mecanismos antioxidantes no sangue e líquido amniótico de cordeiros pré-termos submetidos ou não ao tratamento com surfactante no período pós-nascimento imediato;

4) Verificar as principais alterações pulmonares funcionais em resposta à terapia instituída nos neonatos pré-termos que evoluírem para o óbito.

5) Propor um protocolo terapêutico a ovinos prematuros para manter a adequada função respiratória e, como consequência, asseverar a sobrevivência neonatal.

.....

1.1 HIPÓTESE

A administração preventiva intra-traqueal de surfactante natural porcino (Instituto Butantan[®]) na dose de 100 mg/kg para cordeiros prematuros, associada à assistência ventilatória manual com balão auto-inflável, melhora a condição clínica e respiratória ao longo do período neonatal imediato.

Revisão de Literatura

.....

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO

Compreende o aparelho respiratório, uma porção condutora formada pelas fossas nasais, nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos, apensada à porção respiratória, com terminações da árvore brônquica e parênquima pulmonar, por meio de uma pequena porção tecidual, nomeada de transição (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Nas diversas espécies mamíferas, o desenvolvimento dos pulmões é um fenômeno complexo e contínuo, o qual engloba a maturação e crescimento pulmonar, com início precoce durante a gestação e conclusão somente em vida extra-uterina. Desta maneira, tal evolução pode ser dividida nos seguintes períodos cronológicos: embrionário, fetal e pós-natal (BURRI, 1984). O desenvolvimento embrionário inicia-se com a organização dos folhetos endoderma e mesoderma; e formação do divertículo respiratório a partir do intestino primitivo. Em sequência, originam-se o tubo laringo-traqueal, a traquéia e os brotos pulmonares (O'RAHILLY; MÜLLER; 2010). Durante o desenvolvimento intra-uterino fetal, destacam-se quatro diferentes fases de evolução: pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar (MIYOSHI; GUINSBURG, 1998). Na fase pseudoglandular há a formação de todos os elementos pulmonares, exceto aqueles envolvidos com as trocas gasosas (PRINGLE, 1986). Este estágio compreende a formação de toda a via aérea condutora, revestida por epitélio colunar alto em porção proximal aos túbulos aéreos e por células cubóides na porção distal (MIYOSHI; GUINSBURG, 1998). Ainda neste momento, os capilares estão fundidos, contendo tecido intersticial abundante, são pequenos e com baixo fluxo sanguíneo, o que torna a troca gasosa inviável (PRINGLE, 1986; MIYOSHI; GUINSBURG, 1998).

Em fetos humanos, Miyoshi e Guinsburg (1998) fundamentaram que a transição da fase pseudoglandular à canalicular é caracterizada por uma intensa redução do mesênquima intersticial pulmonar. Em contraposição, Sipriani et al. (2009) evidenciaram, em fetos caninos, um aumento das células mesenquimais

.....

durante o período recíproco, sugerindo a existência de discretas variações histológicas no desenvolvimento pulmonar entre as espécies mamíferas.

O estágio canalicular é pautado pela intensa neovascularização do interstício pulmonar e pela transição para a porção respiratória dos pulmões, pois os bronquíolos terminais dão origem aos bronquíolos respiratórios, que por sua vez dividem-se e formam os ductos alveolares (BURRI, 1984; MIYOSHI; GUINSBURG, 1998). Ainda nesta fase, há a diferenciação dos pneumócitos tipo I a partir das células epiteliais. Estas diminuem em altura e aplainam-se, tendo o citoplasma muito delgado, desmossomos conectores e zônulas de oclusão, as quais impedem a passagem de fluidos intersticiais para a unidade respiratória (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Ademais à discriminação dos pneumócitos tipo I, surgem células acidófilas e globosas nomeadas de pneumócitos tipo II ou células septais. Estas desenvolvem processos citoplasmáticos, tornam-se ricas em glicogênio e elevam a quantidade de corpos multilamelares, responsáveis pelo futuro armazenamento do surfactante (BURRI, 1984; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Em consequência a tais transformações, faz-se viável a troca gasosa pulmonar (BURRI, 1984; MIYOSHI; GUINSBURG, 1998).

No estágio sacular, ocorre um intenso adelgaçamento epitelial concomitante à proliferação dos sacos terminais. Alguns destes formarão os ductos alveolares, enquanto outros migrarão para a periferia do parênquima, originando os sacos alveolares (O'RAHILLY; MÜLLER, 2010). Consequente a estas transformações, há grande expansão da área de troca gasosa pulmonar, com a relação pressão-volume sacular semelhante ao indivíduo adulto. Inicia-se, ainda, a maturação funcional dos pulmões, quando o surfactante começa a ser sintetizado (MIYOSHI; GUINSBURG, 1998).

Na última fase, a alveolar, os pulmões são capazes de realizar trocas gasosas com eficiência, visto que a membrana alvéolo-capilar é suficientemente delgada para permitir o transporte passivo de gases (MOORE; PERSAUD, 2004). O estroma mesenquimal é gradualmente substituído por uma fina camada de fibra, fibroblastos, macrófagos alveolares, pneumócitos e capilares (MIYOSHI; GUINSBURG, 1998).

O estágio de desenvolvimento pulmonar ao nascimento varia entre as diferentes espécies, entretanto, todas encontram-se no estágio mínimo de desenvolvimento sacular. Para a espécie ovina, fetos aos 129 dias de gestação

.....

apresentam expansão pulmonar moderada, com bronquíolos respiratórios terminados em ácinos imaturos, formados por sáculos e discreta evidência de septação alveolar, com espessamento da parede inter-septal (LIPSETT et al., 2000). Ainda, Sozo et al. (2006) atestaram que cordeiros nascidos aos 133 dias de gestação não apresentam alterações na proporção de pneumócitos tipo I e II ao longo das 8 primeiras semanas de vida, contrariamente a neonatos termos, os quais apresentam uma inversão desta proporção, com o aumento significativo dos pneumócitos tipo II.

O completo desenvolvimento do pulmão estende-se até o período pós-natal, quando há um importante aumento no número de alvéolos pulmonares. Este mecanismo é especialmente tardio em cães, ratos e humanos, cuja formação alveolar ao nascimento não ultrapassa 10% (BURRI, 1984; BANKS, 1992). Todavia, em cordeiros, o parênquima pulmonar esteja integralmente alveolarizado ao nascimento, o adequado desempenho da função respiratória depende de muitos outros fatores, tais como a produção e maturação da substância surfactante (DOCIMO et al., 1991; MOORE; PERSAUD, 2004).

2.2 O SISTEMA SURFACTANTE FETO-NEONATAL

Em geral, o surfactante é um complexo lipídico protéico composto por 90 a 95% de lipídeos, 5 a 10% de proteínas e pequena porcentagem de hidratos de carbono (BEPPU, 1998). São quatro as proteínas constituintes do surfactante, SP-A, SP-B, SP-C e SP-D, cada uma com atividades distintas na função respiratória. As SP-A e SP-D são glicoproteínas hidrofílicas e compõem os dois sub-grupos mais abundantes. Apresentam morfologia rara e auxiliam no processo de adsorção de fosfolipídeos, em especial a dipalmitoilfosfatidilcolina, ou L- α -lecitina (HALL et al., 1994). Ademais, pertencem ao grande grupo das colectinas, cuja principal função é opsonizar patógenos, como vírus e bactérias, facultando a fagocitose de macrófagos e monócitos (WRIGHT, 2003). Por sua vez, SP-B e SP-C são proteínas hidrofóbicas de baixo peso molecular, fundamentais para que ocorra o perfeito desempenho da função pulmonar, pois facilitam a rápida adsorção do surfactante na interface ar-

líquido e possuem funções específicas de constituição, estabilização e purificação na superfície do alvéolo (HALL et al., 1994; HAWGOOD, 1997; BEPPU, 1998). A combinação da SP-B com fosfolípidos do surfactante mimetiza a maior parte das funções biofísicas *in vivo* (RIDER et al., 1993) e sua deficiência congênita total ou inativação por anticorpos é incompatível com a vida (NOGEE et al., 1994).

Dentre os fosfolípidos, a fosfatidilcolina é o principal componente e compreende 76,6% da massa lipídica total. Deste valor, 40,4% apresenta-se na forma saturada, com duas cadeias de ácidos graxos saturados e 36,2% na forma insaturada (REBELLO; DINIZ, 2000). Em menores proporções, encontram-se os fosfolípidos esfingomielina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, os quais colaboram com a redução da tensão superficial. Ademais, há um grupo de lípidos neutros, composto pelo colesterol, diacilglicerol e esfingomielina, cuja função ainda não está completamente estabelecida (HARWOOD, 1987; VELDHUIZEN et al., 1998).

Cabe aos pneumócitos do tipo II sintetizar, estocar e secretar o surfactante para o lúmen alveolar (BRASCH et al., 2004). Tal síntese é influenciada por pH, temperatura corpórea e perfusão sanguínea e é comprometida em quadros de hipovolemia, hipoxemia e acidose (BITTAR, 2000). Este processo é relativamente lento e em animais prematuros, é ainda mais retardado. Em ovelhas adultas, são necessárias 25 horas para que haja a produção e liberação da fosfatidilcolina na unidade aérea, todavia, em cordeiros prematuros, tal processo estende-se por 40 horas (JOBE, 1988). Após ser sintetizado, o surfactante é armazenado nos corpos lamelares dentro do citoplasma dos pneumócitos tipo II (BRASCH et al., 2004). As proteínas hidrofílicas são sintetizadas pelo retículo endoplasmático rugoso e possivelmente são adicionadas aos corpos lamelares após sua síntese (IKEGAMI et al., 1992). Sequencialmente, o surfactante é secretado por exocitose dos corpos lamelares e o conteúdo sofre uma transformação estrutural dentro dos alvéolos, originando a mielina tubular (BRASCH et al., 2004; REBELLO, DINIZ; 2000).

A presença do surfactante no lúmen alvéolo-sacular é particularmente crítica ao nascimento, momento em que há desobstrução das vias aéreas do fluido fetal e estabelecimento da respiração regular em um breve período de tempo (JOBE; IKEGAMI, 1994). Sendo assim, a principal função do surfactante é interdigitar-se entre as moléculas de água da fase aquosa do filme superficial alveolar e reduzir as

.....

propriedades de coesão, diminuindo a tensão superficial, em especial ao final da expiração (REBELLO; DINIZ, 2000). Com isso, o surfactante estabiliza os alvéolos, garante que estes permaneçam de tamanho uniforme e evita o seu colapso (MIYOSHI; GUINSBURG, 1998). Por meio deste mecanismo, também ocorre menor passagem de líquidos intersticiais para o interior do alvéolo, dificultando a formação do edema pulmonar, frequente em crianças prematuras ao nascimento (REBELLO; DINIZ, 2000).

2.2.1 Terapia de reposição de surfactante em neonatos

Inicialmente nomeada como doença das membranas hialinas, em 1903, a Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) é a principal disfunção do período neonatal em Medicina Humana e acomete, especialmente, recém-nascidos prematuros e com baixo peso corpóreo, dos quais 25% evoluem para o óbito (MIYOSHI; GUINSBURG; KOPELMAN, 1998). O quadro clínico caracteriza-se por insuficiência respiratória ao nascimento, combinada a fases de taquipnéia, ruído expiratório e cianose central (BITTAR, 2002).

Em 1959, os pesquisadores Avery e Mead constataram a deficiência de surfactante pulmonar em neonatos humanos acometidos pela SDR. Atualmente, a fisiopatologia da SDR envolve fatores relacionados à imaturidade pulmonar geral, dentre eles, destacam-se a deficiência e inativação do surfactante alveolar, o desenvolvimento estrutural incompleto do parênquima pulmonar e a instabilidade músculo-esquelética da caixa torácica, que leva à inspiração paradoxal pouco efetiva e aumento do trabalho respiratório (MIYOSHI; GUINSBURG; KOPELMAN, 1998).

Com base nos achados pioneiros da década de 50, a primeira tentativa clínica de reposição de surfactante a bebês prematuros envolveu a administração de dipalmitoilfosfatidilcolina em aerossol, com resultados desanimadores (CHU et al., 1967). Após esta tentativa vanguardista, sucederam-se muitos estudos pouco exitosos, todavia, em 1980, Fujiwara et al. relataram resultados satisfatórios na

.....

evolução de neonatos humanos submetidos à administração de surfactante extraído de pulmões bovinos.

Em humanos, a resposta individual à terapia com surfactante em neonatos é variável (BEPPU, 1998). Mas, em geral, desde o início de sua aplicação em Medicina Humana, em 1990, a terapia de reposição de surfactante contribuiu para a diminuição da incidência de morte, pneumotórax e hemorragia intra-ventricular, culminando em melhora acentuada, observada em termos de maior oxigenação arterial e complacência pulmonar (BEPPU, 1998; STEVENS; SINKIN, 2007).

Atualmente, existem dois tipos de surfactante utilizados na rotina clínica humana, o natural e o sintético. O primeiro é extraído de pulmões suínos ou bovinos e apresenta em sua composição fosfolipídeos na proporção fisiológica e as proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C (SOLL; DARGAVILLE, 2000). As proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D perdem-se no processo de extração lipídica com solventes orgânicos. O segundo é um composto sintético de fosfolipídeos em concentrações semelhantes ao natural, porém sem a presença de proteínas (SOLL; DARGAVILLE, 2000). Como consequência, o surfactante sintético possui diminuída ação biológica e menor resistência à inativação por proteínas intra-alveolares. Ambos são efetivos no tratamento da SDR, todavia, neonatos submetidos à terapia com o produto natural apresentaram menor índice de mortalidade e intercorrências pulmonares (SOLL; DARGAVILLE, 2000). Surfactantes sintéticos de última geração são elaborados com peptídeos que mimetizam a ação biofísica das proteínas, contudo, estudos de eficácia e segurança ainda estão em andamento (REBELLO, 2008).

Em Medicina Humana, a instilação intra-traqueal por meio da intubação é a única via de administração corrente do surfactante (SHAH, 2011). Esta aplicação, quando associada a pressões de ventilação contínuas positivas (CPAP), maximiza a ação do surfactante, visto que uniformiza sua distribuição (HILGENDORFF et al., 2006). Todavia, os procedimentos de intubação em neonatos estão associados às severas co-morbidades, tais como pneumotórax, perfuração esofágica, extubação acidental e obstrução da sonda (SHAH, 2011). Em somatória, apnéia, hipóxia transitória e alterações em pressão sanguínea e intra-craniana também são correlacionadas às intubações endotraqueais (MARSHALL et al., 1984). Estudos recentes apontam para a terapia de reposição com surfactante por meio de nebulização, administração em máscara laríngea ou por aerossol, porém, até o

.....

presente momento, estas técnicas não se mostraram seguras e eficientes (TREVISANUTO et al., 2005; MAZELA; MERRITT; FINNER, 2007).

A administração do surfactante pode ser realizada de forma profilática ou terapêutica, sendo esta última sub-dividida em precoce ou tardia. A estratégia profilática é realizada nos primeiros 15 minutos pós-natal e garante menor mortalidade e incidência de complicações, como pneumotórax (REBELLO, 2008). Todavia, acarreta maiores custos de tratamento, pois, eventualmente, são tratados recém-nascidos que não desenvolveriam a SDR (SOLL; MORLEY, 2000). Faz-se o tratamento terapêutico precoce após o diagnóstico da SDR, em um período máximo de 2 horas do nascimento. Em comparação ao tratamento tardio, apresenta maior efetividade, pois o edema alveolar e a atelectasia não estão totalmente estabelecidos, possibilitando melhor ação do surfactante (REBELLO, 2008). Ademais, o surfactante distribui-se de forma mais uniforme quando administrado imediatamente ao nascimento, ainda com os pulmões repletos de líquido (ADAS; ALBUQUERQUE; ZUCCHI, 2005).

Em Medicina Veterinária, a SDR foi descrita em cães da raça Dálmata, de 4 a 10 meses de idade (JÄRVINEN et al., 1995). Nestes, houve rápida progressão da doença, com óbito ou eutanásia em 3 semanas em média. Os primeiros sinais clínicos foram taquipnéia e ruído respiratório, seguidos de progressiva dispnéia, cianose, padrão respiratório superficial e ruidoso, letargia, anorexia e vômitos. Não há relatos da afecção em cães no período neonatal. Em potros, os distúrbios respiratórios, dentre eles a SDR, são frequentes e responsáveis por 3,6 a 5 % de mortalidade neonatal (KOSCH, 1984). Para esta espécie, os principais sinais clínicos reportados na SDR são aumento da frequência e esforço respiratórios, hipoxemia, hipercapnia e acidose respiratória (LAMB et al., 1990). Eigenmann et al. (1984) relataram a ocorrência de SDR em 20 bezerros de um total de 35 nascidos de cesariana eletiva próximo ao termo. Os neonatos afetados apresentaram como principal sintomatologia dispnéia expiratória com retração dos dois últimos pares de costela durante a expiração, ademais à acidose metabólica. O quadro clínico agrava-se progressivamente com morte nas 60 horas seguintes. Em cordeiros, não há relatos da ocorrência espontânea da SDR no período neonatal, todavia, esta espécie serve como modelo experimental de injúria pulmonar para a Medicina Humana. Sendo assim, há vasta descrição literária sobre o tema, porém, nestes

.....

estudos, os neonatos são eutanasiados após a fase experimental e em consequência, dados sobre a evolução clínica de cordeiros acometidos continuam escassos.

2.3 O SISTEMA ANTIOXIDANTE FETO-NEONATAL

Os recém-nascidos possuem sistemas de defesa antioxidante parcialmente desenvolvidos, pois em vida fetal, estes foram expostos a baixas tensões de oxigênio (O_2). Após o nascimento, com o início do metabolismo aeróbico, há significativo aumento no consumo de O_2 , desencadeando a produção de radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial (VLESSIS; MELA-RIKER, 1989). Cerca de 5 % do O_2 consumido pelas células é metabolizado na forma das espécies reativas radical, tais como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), as quais podem ser formadas por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Compõem as reações enzimáticas aquelas envolvidas na cadeia respiratória, nos processos oxidativos de células polimorfonucleares, na síntese de prostaglandinas e leucotrienos por intermédio da cascata do ácido araquidônico e nas situações de isquemia-reperfusão por meio da cascata da hipoxantina, formada durante a hipóxia (CROSS et al, 1987).

O mecanismo de toxicidade do oxigênio é atribuído às reações dos radicais livres de O_2 com componentes celulares. Tais lesões podem ser diretas, como: ruptura de membrana lipo-protéica; destruição de funções enzimáticas; alteração estrutural de proteínas, ácidos nucleicos, lípides e carboidratos; alteração da permeabilidade vascular; degradação oxidativa em moléculas de longa duração, como colágeno e em glicosaminoglicanos e fibrose arterio-capilar. Ainda, há lesões indiretas, devido a distúrbios de homeostase do cálcio intracelular, com consequente ativação da xantina-oxidase (metabólito da cascata da hipoxantina), fosfolipase A2 (metabólito da cascata do ácido araquidônico) e morte celular (FREEMAN; CRAPO, 1982; RODRIGUES, 1998).

O nascimento é um desafio oxidativo ao neonato. A transição feto-neonatal expõe o recém-nascido a um ambiente muito mais rico em O_2 , que pode ser tóxico

.....

aos tecidos neonatais (BUONOCORE; GROENENDAAL, 2007). Dentre eles, o tecido cerebral apresenta grande vulnerabilidade ao dano oxidativo devido ao elevado requerimento de O_2 e a grande presença de moléculas lipídicas insaturadas em sua composição (LIEVRE et al., 2001). Desta maneira, a aplicação terapêutica de O_2 na reanimação neonatal, embora necessária para o suporte da vida em diversas instâncias, apresenta caráter potencialmente tóxico a muitos tecidos e órgãos (RODRIGUES, 1998). A imaturidade dos diversos sistemas antioxidantes do neonato propicia condições para o desenvolvimento de afecções nas quais os radicais livres atuam como mecanismo patogênico.

Vento et al. (2003) demonstraram que a hipóxia eleva o estresse oxidativo no período pré-natal e a reanimação com 100% de O_2 acarreta hiperoxemia e agrava o estresse oxidativo durante o primeiro mês de vida. Níveis elevados de radicais livres e metabólitos da oxidação protéica estão presentes no plasma de neonatos hipóxicos prematuros, no momento do parto e aos sete dias de vida (BUONOCORE et al., 2002).

As injúrias causadas pelos radicais livres de O_2 são combatidas por defesas antioxidantes enzimáticas, por meio da superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) e não enzimáticas, como as vitaminas E, C, ácido úrico, bilirrubina, etc. A SOD catalisa a reação em que duas moléculas de O_2^- formam uma molécula de H_2O_2 e outra de O_2 . Posteriormente, o H_2O_2 é destruído pela catalase ou pela GPx, transformando-o em duas moléculas de H_2O e uma de O_2 (NICHII et al., 2007). A catalase é uma das enzimas mais eficientes dentre as conhecidas, pois nenhuma concentração de H_2O_2 pode saturá-la (LEEDÍAS et al., 1998). Por sua vez, a GPx dependente de selênio catalisa a reação de metabolização da H_2O_2 com a glutathione reduzida (GSH), usada como substrato, resultando em H_2O e glutathione oxidada (GSSG) (NICHII et al., 2007).

O perfil plasmático de agentes antioxidantes neonatal humano apresenta baixos níveis de GPx, SOD, betacaroteno, riboflavina, riboproteínase, vitamina E, selênio dentre outros fatores (GOPINATHAN et al., 1994). Em Medicina Veterinária, faltos são os estudos sobre a competência antioxidante em recém-nascidos ovinos.

2.4 ASSISTÊNCIA VENTILATÓRIA NEONATAL

Em Medicina, os protocolos de assistência cardiorrespiratória ao neonato são bem definidos e utilizados rotineiramente. Nas salas de parto, doutrina-se como objetivo primário o estabelecimento da efetiva ventilação pulmonar a neonatos em apnéia, respiração irregular e/ou bradicardia. Perlman e Risser (1995) atestaram que aproximadamente 66% dos recém-nascidos submetidos a suporte ventilatório inicial incorreto ou ineficaz apresentam depressão neonatal contínua. Estudos em cordeiros, cães e humanos admitem que a administração de pressões positivas durante a ventilação é salutar, pois melhora a função pulmonar ao diminuir a resistência das vias aéreas superiores, desobstruindo-as; eleva a capacidade residual funcional; diminui a resistência à inspiração; amplia a perfusão pulmonar e troca gasosa; mantém o surfactante na superfície alveolar, entre outras vantagens (SAUNDERS et al., 1976; FARIDAY, 1976; COTTON et al., 1980). Todavia, a ventilação com pressão positiva deve ser cuidadosamente controlada, a fim de evitar injúrias pulmonares, tais como barotraumas (à elevada pressão de inspiração), volutraumas (excessivo volume corrente e superextensão pulmonar), atelectraumas (sucessivas reexpansões e colapsos alveolares) e, ainda, biotraumas (inflamação ou infecção do parênquima pulmonar) (SCHMÖLZER et al., 2008). Tais alterações ocasionam o extravasamento de fluido proteináceo e sanguíneo para o interior das vias aéreas, alvéolos e interstício e, em consequência, inibem a produção e atuação do surfactante, interferindo no adequado desempenho dos pulmões (ATTAR; DONN, 2002).

A injúria pulmonar associada à inflamação é um complexo processo, no qual as citocinas possuem papel importante (HALBERTSMA et al., 2005). O processo inflamatório, especialmente por meio do TNF alfa e IL-1, reduz a função do surfactante pela ação direta sob seus componentes e, ainda, indiretamente, ao induzir o extravasamento alveolar de proteínas, que, em consequência, inibem a função do surfactante (KOBAYASHI et al., 1991; RIMENSBERGER, 2002). Ademais, tais citocinas estimulam a ativação do fator de necrose kB, resultando na ativação e quimiotaxia de polimorfonucleares e demais células inflamatórias (LIM; WAGNER, 2003). O biotrauma subsequente à ventilação mecânica não permanece limitado aos

.....

pulmões, de modo que a elevação generalizada de citocinas pode acarretar a instituição da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e a apoptose celular em diversos órgãos (HALBERTSMA et al., 2005).

Em Medicina Humana, o balão auto-inflável é o primeiro modo ventilatório destinado a neonatos com insuficiência respiratória imediata ao nascimento. Apresenta como vantagens o fácil manuseio, a aplicação sem a necessidade de fonte de gás e o baixo custo (ALMEIDA; GUINSBURG, 2011). Todavia, tal modalidade acarreta variável vazamento de gás entre a máscara e a face do neonato e, em consequência, o volume corrente de gás administrado é impreciso, podendo gerar hipoinsuflação mesmo com pressão de inspiração adequada (O'DONNELL et al., 2005). Ademais, há moderada imprecisão da válvula de segurança, usualmente regulada a 40 cm de H₂O. Resende et al. (2006) mensuraram o pico de pressão inspiratória (PIP), o volume corrente e a FR durante a ventilação de cordeiros prematuros com o uso do balão auto-inflável. Como resultado, em 49,1% das vezes, os médicos ultrapassaram o PIP de 40 cm de H₂O, em 37,7% das vezes, o volume corrente foi igual ou maior a 20 mL/kg e 70% dos médicos avaliados ultrapassaram os 40 cm de H₂O em mais de 6 ventilações, contribuindo com a indução de biotrauma.

Opta-se pela ventilação com intubação traqueal nas circunstâncias em que a ventilação com máscara facial não tenha sido efetiva, em ventilações prolongadas; aplicação de massagem cardíaca e/ou adrenalina; nas más formações congênitas; como hérnia diafragmática; assim como, em neonatos prematuros, candidatos à terapia com surfactante exógeno profilático (ALMEIDA; GUINSBURG, 2011). Outrossim, a indicação da intubação traqueal vincula-se à habilidade e experiência do profissional responsável, uma vez que há elevado risco de complicações, como hipoxemia, apneia, bradicardia, pneumotórax, perfuração traqueal ou esofágica e maior risco de infecção (ALMEIDA; GUINSBURG, 2011).

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no período de fevereiro de 2011 a maio de 2012, servindo-se de 15 fêmeas híidas previamente selecionadas e seus respectivos neonatos. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram alocados em duas baias cobertas, com aproximadamente 20 m² cada, situadas na FMVZ-USP, *campus* São Paulo. Às fêmeas gestantes, ofertou-se água, feno de capim e sal mineral *ad libitum*, além de ração comercial específica para a espécie (Ovicorte Master, Guabi[®]), uma vez ao dia.

As condições de utilização destes animais vão ao encontro das normativas éticas do emprego de animais em experimentos avaliadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição.

3.1 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ao longo do meses de fevereiro e março de 2011, 15 ovelhas jovens (2 a 6 anos), mestiças, clinicamente saudáveis, sem histórico de alterações reprodutivas prévias, foram submetidas à avaliação ultrassonográfica, com o objetivo de identificar a atividade ovariana e hígidez uterina. Ao confirmar a atividade ovariana cíclica, as fêmeas foram submetidas a protocolo reprodutivo, servindo-se de dois reprodutores. Para a indução de cio natural, foi administrado a cada fêmea, 2,5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse[®], Pfizer) pela via IM. Após 2 dias da aplicação, iniciou-se a atividade de rufiação, expondo o reprodutor a cada fêmea duas vezes ao dia. Ao início do comportamento receptivo, as montas naturais foram executadas a cada 12 horas até o final do comportamento de aceitação ao macho. O período gestacional foi considerado aquele a partir de 24 horas do primeiro dia de cobertura para cada fêmea (JAINUDEEN; HAFEZ, 2001). As ovelhas foram assistidas pontualmente durante a gestação para verificar a hígidez materna e fetal, bem como a incidência de gestações múltiplas.

Para a indução do parto aos 135 dias de gestação, foram feitas duas aplicações sub-cutâneas (SC) do antiprogestágeno aglepristona (Alizin[®], Virbac), a

.....

cada 24 horas, na dose de 10 mg/kg. A primeira aplicação ocorreu 41 horas prévias à data estimada do parto.

Ao início do trabalho de parto, as fêmeas foram monitoradas continuamente por meio do exame obstétrico completo. Fetos em apresentação posterior ou em estática fetal distócica foram excluídos deste experimento. Imediatamente ao nascimento, os neonatos foram secos com e vigorosamente estimulados por meio de massagem torácica e mantidos em berço aquecido (Fanen[®]) para manutenção térmica. Então, tiveram a cavidade oral e condutos nasais gentilmente aspirados, com o uso de sonda uretral nº 06 (Mark Med[®]) acoplada a aspirador de secreções (Nevoni[®]) e, finalmente, foram pesados na balança digital Smart Prata (Plenna[®]) para cálculo da correta dose de surfactante a ser administrado. Após estes procedimentos iniciais, foram alocados no seguintes grupos experimentais:

GRUPO SURFACTANTE 1 (SURF 1) (n = 05): administração, em única dose, pela via traqueal, de 100 mg/kg do surfactante pulmonar natural de origem suína (Instituto Butantan[®]), previamente aquecido a 37 °C, ato contínuo à intubação da traquéia;

GRUPO SURFACTANTE 2 (SURF 2) (n = 06): administração pela via traqueal, de 100 mg/kg do surfactante pulmonar natural de origem suína (Instituto Butantan[®]), previamente aquecido a 37 °C, em duas doses de igual volume, aos 30 e 60 minutos da intubação traqueal e início da ventilação manual assistida;

GRUPO SURFACTANTE 3 (SURF 3) (n = 06): administração pela via traqueal, de 100 mg/kg do surfactante pulmonar natural de origem suína (Instituto Butantan[®]), previamente aquecido a 37 °C, em três doses de igual volume, aos 20, 40 e 60 minutos da intubação traqueal e início da ventilação manual assistida;

GRUPO VENTILAÇÃO (VEN) (n = 05): os cordeiros pertencentes a este grupo não receberam surfactante exógeno, porém foram ventilados conforme detalhamento que se segue.

Os neonatos componentes de todos os grupos foram submetidos à assistência ventilatória manual com balão auto-inflável neonatal humano tipo Ambu (Oxigel[®]), de 250 mL de volume, válvula de segurança limitada a 40 ± 05 cm de H₂O e com manômetro de pressão (Oxigel[®]) acoplado ao balão auto-inflável (Figura 1A). Entre 5 e 10 minutos do nascimento, após os procedimentos experimentais iniciais,

os neonatos foram submetidos à intubação traqueal, com cânulas de intubação nº 3,0 ou 3,5 com cuff (Solidor®), guiadas por laringoscópio tradicional (Oxigel®) conectado à lamina reta ou curva nº 1 (Oxigel®). As sondas traqueais foram acopladas ao balão auto-inflável por meio de um conector plástico (Oxigel®). Então, os cordeiros foram ventilados por 2 horas consecutivas, na frequência respiratória (FR) entre 60 e 70 mrpm e pressão entre 30 e 40 cm de H₂O (Figura 1C). Ao longo deste período, os neonatos eram reposicionados frequentemente, de modo a não permanecerem durante prolongado período em um mesmo decúbito.

Figura 1 – Equipamentos utilizados na assistência neonatal **A:** Balão auto-inflável neonatal humano tipo Ambu (Oxigel®), de 250 mL de volume, válvula de segurança limitada a 40 ± 05 cm H₂O e com manômetro de pressão acoplado. **B:** Material para intubação traqueal e instilação do surfactante, contendo laringoscópio acoplado à lâmina (Oxigel®), cânula de intubação com cuff (Solidor®), conector plástico e sonda uretral (Mark Med®). **C:** neonato em berço aquecido, intubado e ventilado.

.....

O surfactante utilizado neste experimento tem origem suína e apresenta-se como uma suspensão estéril, não pirogênica, com aproximadamente 100 mg de fosfolípídeos, na concentração média de 25 mg/mL (Instituto Butantan[®]). A porção fosfolipídica contém, aproximadamente, 51% de fosfatidilcolina, 26% de fosfatidiletanolamina, 8% de fosfatidilglicerol e 15% de fosfatidilinositol-fosfatidilserina. Ainda, abrange de 5,6 a 10% dos polipeptídeos hidrofóbicos SP-B e SP-C.

A instilação traqueal de surfactante foi realizada por meio de sonda plástica uretral (Mark Med[®]), nº 04, inserida dentro da cânula traqueal, através do conector plástico (Figura 1B). Durante a administração, os neonatos foram posicionados em decúbito ventral, com leve extensão do pescoço, submetidos à tapotagem pulmonar e continuamente ventilados, a fim de facilitar a adsorção do surfactante pelas vias aéreas.

O presente estudo foi delineado como duplo-cego, de modo que a equipe de avaliação clínica não soubesse, durante todo o experimento, a qual grupo pertenciam os neonatos.

3.2 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Amostras de líquido amniótico (LA) foram colhidas no momento do parto, a partir da membrana amniótica intacta, aspirando-se um volume mínimo de 5 mL com auxílio de seringa plástica descartável e agulha 40x12 descartável estéreis. Estas foram então, centrifugadas a 2000 xg, por 10 minutos, aliquotadas, armazenadas em tubos plásticos e congeladas a -20 °C até o processamento, como descrito a seguir.

3.2.1 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise do estresse oxidativo das amostras de LA foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP,

segundo protocolo descrito por Nichi et al. (2007), que baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea, quantificado por espectrofotometria, no comprimento de onda de 532 nm.

Para esta reação, foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético à 10% (TCA 10%) a 4 °C em alíquotas de 250 µL de LA, para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação (20.000 xg, 5 °C, 15 minutos), foram colhidos 500 µL do sobrenadante. Então, este foi diluído em 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA, 1% diluído em 0,05 M de hidróxido de sódio), mantido em banho de água quente a 100 °C, por 15 minutos e, então, imediatamente resfriado em banho de gelo (0 °C), para interrupção da reação química. As TBARS foram quantificadas por espectrofotometria, com comprimento de onda de 532 nm (Ultrospec 3300 pro[®], Amersham Biosciences). Os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com solução de MDA e expressos em ng/mL.

3.2.2 Quantificação da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx)

A dosagem de GPx seguiu a técnica descrita por Nichi et al. (2007), em que a 50 µL de LA, foram adicionados 10 µL de solução de azida sódica 0,25 M, 10 µL de solução de GSSG redutase, 50 µL de solução de glutathiona reduzida (GSH) 20 mM, 330 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, 500 µL de solução de NADPH 0,2 mM e 50 µL de solução de t-butilhidroxiperoxido (tBPH). Então, a solução foi avaliada por espectrofotometria, com comprimento de onda de 340 nm, durante 600 segundos. O resultado, em U/mL, foi calculado baseando-se na absorbância/min da amostra avaliada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro[®], Amersham Biosciences) e no coeficiente de extinção molar do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), conforme equação a seguir:

$$\text{Concentração da GPx} = \frac{\Delta \text{ absorbância da amostra}}{6,22} \times 20 \times \text{diluições}$$

3.2.3 Quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da enzima antioxidante SOD foi realizada segundo a técnica proposta por Flohé e Ötting (1984). A atividade da SOD é medida indiretamente, através da taxa de redução do citocromo C pelo O_2^- , controlada por 05 minutos. e tendo o sistema xantina-xantina oxidase como fornecedor constante de O_2^- . A SOD presente na amostra compete com o citocromo C pelo O_2^- e a atividade enzimática é medida determinando-se a taxa de diminuição da redução do citocromo C. O meio de reação deve conter 1 μ L de citocromo C (Sigma®, C3381), 50 μ L de xantina (Sigma®, X 2252), 100 μ L de EDTA e 50 μ L de tampão fosfato de sódio (Sigma®, S 9638) a pH 7,8. Realiza-se, então, a adequação da atividade enzima xantina oxidase necessária para geração de O_2^- e redução do citocromo C em 0,025 unidades de absorbância por minuto, pois uma unidade de atividade da SOD total corresponde a 50% deste valor. O cálculo da concentração de SOD na amostra segue a fórmula a seguir:

$$\text{SOD} = \frac{(\Delta \text{ absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco})}{(\text{absorbância do branco} / 2)} \times \text{diluições}$$

O ensaio foi realizado a 550 nm e 25 °C e o resultado expresso em U/mL.

.....

3.3 AVALIAÇÕES NEONATAIS

Após a manipulação neonatal inicial, realizada ao longo do primeiro minuto de vida, os seguintes procedimentos experimentais foram adotados, sequencialmente:

3.3.1 Avaliação clínica

O escore Apgar é uma ferramenta semiológica de uso rotineiro em Medicina Humana, pois permite avaliar as principais funções vitais do neonato nos primeiros minutos de vida, detectando sinais precoces de asfixia periparto (VAALA et al., 2006), além de indicar se as medidas preventivas ou curativas adotadas na sala de parto foram eficientes. Segundo Yeoman et al. (1985), o escore Apgar pode auxiliar na diferenciação de neonatos hígidos dos severamente comprometidos, porém não é sensível o suficiente para detectar o comprometimento neonatal menos evidente. Esta assertiva foi corroborada por Silva (2008) em seu estudo com neonatos caninos, para os quais, escores Apgar não foram significativamente diferentes naqueles com graus leve a moderado de hipóxia. Em Medicina Veterinária, adaptações sugerem a avaliação do batimento cardíaco, atividade respiratória, tônus muscular, coloração de mucosas e vocalização ao nascimento (MOON et al., 2001; MOON-MASSAT, ERB, 2002; SILVA, 2008). É importante ressaltar que os componentes do escore de vitalidade ou Apgar estimam a sobrevivência neonatal, pois o êxito dos recém-nascidos também está relacionado à sua habilidade

termorregulatória e à ingestão de colostro no momento adequado (HERPIN et al., 1996).

Nos neonatos do presente experimento, foi procedido o exame físico completo por meio do escore Apgar de vitalidade neonatal adaptado à Medicina Veterinária (Quadro 1). Neste último, avaliaram-se as seguintes variáveis: FC, FR e esforço respiratório, tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração de mucosas, atribuindo-lhes notas de 0 a 2. A somatória das notas específicas de cada variável forneceu o escore Apgar (0 a 10). Ainda, realizou-se auscultação cardiopulmonar minuciosa, com o intuito de detectar eventuais alterações em campos pulmonares e mensurou-se a temperatura corpórea. O exame físico completo, juntamente à temperatura retal, foram realizados ao nascimento e aos 5 minutos, a partir de então, a cada 10 minutos durante os primeiros 90 minutos de vida e, ainda, às 2, 4, 6 e 24 horas pós-natal.

Quadro 1- Parâmetros adotados para o escore Apgar de vitalidade neonatal

VARIÁVEL	ESCORE		
	0	1	2
Frequência Cardíaca	Ausente	Presente, porém bradicárdica FC < 120 bpm	Presente e normal FC = 120 - 220 bpm
Esforço Respiratório / Frequência respiratória	Ausente	Irregular FR < 35 mpm	Regular e vocalização FR = 35 - 90 mpm
Tônus muscular	Flacidez	Alguma flexão	Flexão
Irritabilidade Reflexa	Ausente	Algum movimento	Hiperatividade
Coloração de mucosas	Cianose e palidez	Cianose	Rósea

Fonte: Silva et al. (2009), modificada; Vannucchi et al., prelo.

3.3.2 Hemogasometria arterial

A determinação de valores hemogasométricos tornou-se importante avaliação das condições neonatais em Medicina Humana (RUTH et al., 1988), pois auxilia o diagnóstico diferencial de afecções com origens distintas. As moléculas de O_2 ligadas à hemoglobina (Hb) e dissolvidas no plasma estão em equilíbrio dinâmico (MARGOTTO, 2010). No indivíduo adulto, por volta de 98 a 99% do O_2 no sangue está ligado à Hb, formando a oxi-hemoglobina [$Hb(O_2)$], sendo que o restante 1% do O_2 permanece dissolvido no plasma e pode ser medido como a pressão parcial de O_2 (pO_2). Ou seja, a pO_2 reflete o O_2 dissolvido no plasma e não aquele associado à Hb (MARGOTTO, 2010). Em Neonatologia Humana, a determinação do pH, pO_2 e de pCO_2 , a partir da artéria e veias umbilicais, são avaliações rotineiras necessárias para determinação do grau de acidose metabólica e/ou respiratória, bem como prever a necessidade de cuidados intensivos e correção imediata do desequilíbrio ácido-básico (SIRISTATIDIS et al., 2003). Em cães, Silva (2008) demonstrou que os dados hemogasométricos variam nas distintas condições de parto. Outrossim, em Medicina Veterinária, as avaliações laboratoriais diagnósticas das alterações neonatais não são realizadas como rotina. Por este motivo, os parâmetros para análise das afecções pulmonares comuns a este período de vida ainda não são conhecidos na espécie ovina.

No presente estudo, amostras sanguíneas dos neonatos foram coletadas por punção arterial femoral com o uso de agulhas e seringas estéreis e heparinizadas, nos seguintes momentos, entre 1 e 5 minutos de vida, previamente à instituição do tratamento; com 2 horas de vida, previamente à extubação e com 4, 6 e 24 horas do nascimento.

A análise sanguínea foi realizada pelo analisador clínico portátil i-SAT[®] (Abbott) e forneceu os seguintes dados: pH, pO_2 (pressão de oxigênio – mmHg), pCO_2 (pressão de dióxido de carbono – mmHg), TCO_2 (dióxido de carbono total -

.....

mmol/L), HCO_3^- (bicarbonato – mmol/L), BE (base excess – mmol/L), SpO_2 (saturação de oxigênio - %), íons sódio (Na^+ - mmol/L) e potássio (K^+ - mmol/L).

3.3.3 Avaliação da glicemia e lactato sanguíneos

Desde a década de 50, a mensuração do excesso de lactato tem sido introduzida na prática clínica e experimental (VIVAN, 2010). Em Neonatologia Humana, Shah et al. (2004) evidenciaram que os valores de lactato podem estimar a gravidade de hipóxia perinatal, auxiliando no diagnóstico precoce de recém-nascidos de alto risco. Na via metabólica da glicólise, há a produção do piruvato a partir da degradação de carboidratos. Este serve como substrato a produção de energia por meio de duas vias metabólicas distintas: a aeróbica, ocorrente na mitocôndria, com a produção de 36 moléculas de ATP, CO_2 e H_2O ; e a anaeróbica, em que formam-se, no citoplasma, somente 2 moléculas de ATP, lactato e H^+ (KRUSE; CARLSON, 1987). Na hipóxia tecidual, o piruvato é convertido preferencialmente a lactato, conduzindo ao predomínio do metabolismo anaeróbico (KRUSE; CARLSON, 1987). Assim, a produção do lactato permite a sobrevivência temporária da célula nas situações de hipóxia, conferindo ao lactato o título de marcador da perfusão tecidual (VIVAN, 2010). Em estudo pioneiro, Comline e Silver (1971) avaliaram as concentrações séricas de lactato em cordeiros hípidos, ao longo do período periparto. Os valores mantiveram-se entre 6,65 e 8,87 mmol/L imediatamente ao nascimento, em 4,43 mmol/L após uma hora de vida e com média de 3,32 mmol/L às duas horas pós-natal. Em Medicina Humana, valores de lactato sérico acima de 3,88 mmol/L foram negativamente correlacionados com taxa de sobrevivência, em neonatos portadores da SDR (BECA; SCOPES, 1972).

Foram realizadas as avaliações glicêmica e lactatêmica a partir de amostras colhidas da veia jugular, por meio de agulhas e seringas estéreis, imediatamente depositadas no glicosímetro (Monitor Advantage[®], Roche Diagnóstica) e no aparelho de dosagem de lactato sérico (Accutrend[®] Lactate, Roche Diagnóstica). Procedeu-se a colheita das amostras sanguíneas nos seguintes momentos, entre 1 e 5 minutos

.....

de vida, previamente à instituição do tratamento; também às 2 horas de vida, previamente à extubação e com 4, 6 e 24 horas do nascimento. O resultado da glicemia foi expresso em mg/dL de sangue, enquanto as concentrações de lactato foram expostas em mmol/L de sangue.

3.3.4 Avaliação das concentrações de uréia e creatinina séricas

Nos mesmos momentos supracitados no item 3.3.3, amostras foram colhidas por venopunção jugular, depositadas em tubos estéreis para sorologia e foram então, centrifugadas a 1500 *xg*, durante 10 minutos. O soro sanguíneo dos neonatos foi congelado a -20 °C e avaliado posteriormente.

Para análise da uréia e creatinina séricas, foi utilizado o aparelho de bioquímica automatizado Bioplus BIO 2000/200[®] e reativos comerciais (Labtest[®]). A uréia foi determinada por método enzimático ultra-violeta, e a creatinina por método cinético, ambas com resultados expressos em mg/dL.

3.3.5 Avaliação do sistema antioxidante neonatal

O perfil oxidativo dos neonatos foi avaliado por meio das TBARS séricas e das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT presentes nos eritrócitos. Para a determinação das TBARS, amostras sanguíneas foram coletadas a 0, 2, 4, 6 e 24 horas do nascimento, por venopunção jugular, depositadas em tubos estéreis para sorologia e foram então, centrifugadas a 1500 *xg*, durante 10 minutos. A partir do soro sanguíneo dos neonatos, foi realizada a determinação da atividade das TBARS, conforme técnica anteriormente descrita para as determinações no LA (item 3.2.1 deste capítulo).

.....

As avaliações das enzimas antioxidantes foram realizadas em amostras de lisado de papa de hemácias, como detalhadas a seguir.

3.3.5.1 Confeção da papa de hemácias e do lisado de papa de hemácias

Para a confecção da papa de hemácias, amostras sanguíneas foram coletadas aos 0, 2, 4, 6 e 24 horas do nascimento, por venopunção jugular, depositadas em tubos estéreis para hemograma contendo anticoagulante heparina litium, desconectando-se a agulha da seringa e centrifugadas a 1500 rpm, 4 °C, durante 10 minutos, com aceleração e desaceleração lentas. O plasma sanguíneo foi gentilmente aspirado, aliquotado e congelado a -20 °C. Adicionou-se, então, solução de PBS à temperatura ambiente, no volume duas vezes maior que o pellet de células restantes, homogeneizou-se lentamente e procedeu-se nova centrifugação a 1500 rpm, 4 °C, durante 10 minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado e esta etapa de lavagem das hemácias foi novamente repetida. Após a segunda lavagem, 3 alíquotas de 200 µL de papa de hemácias, acondicionadas em eppendorf âmbar, foram congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) até o momento do processamento.

A partir das amostras de lisado de papa de hemácias, foram mensuradas as concentrações de Hb e das enzimas antioxidantes estudadas.

3.3.5.2 Quantificação da concentração de hemoglobina (Hb) na amostra

A concentração de Hb das amostras de lisado de papa de hemácias foi calculada a partir de método proposto por Drabkin e Austin (1935). Neste, o íon Fe^{2+} do grupo heme da Hb, oxiHb e carboxiHb é oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}) pelo

.....

ferricianeto, originando a hemiglobina. Esta se combina com o cianeto ionizado para produzir o cianeto de hemiglobina, o qual é medido em espectrofotometria.

O volume de 10 µL de lisado de papa foi adicionado a 2,5 mL de reagente de cor de uso (Anexo A), homogeneizado e mantido em ambiente protegido de luz, à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após, a leitura da absorbância do teste foi realizada no aparelho de espectrofotometria (Ultrospec 3300 pro[®], Amersham Biosciences), a 540 nm, acertando o zero com água destilada.

A concentração de Hb da amostra, expressa em g/dL, foi calculada com base na equação disposta a seguir:

$$\text{Hemoglobina (g/dL)} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância padrão}} \times 10$$

3.3.5.3 Quantificação da enzima antioxidante catalase (CAT) nos eritrócitos

A atividade da catalase é determinada avaliando-se o consumo do H₂O₂ durante 8 minutos pela leitura espectrofotométrica (Ultrospec 3300 pro[®], Amersham Biosciences), a 230 nm e 30 °C (BEUTLER, 1975). O meio de reação deve conter 10 µL de amostra, tampão Trisaminometano (50 mM) / EDTA (250 mM), com pH 8,0 e 900 µL de H₂O₂, concentração final de 9,0 mM. Os cálculos consideram o valor 0,071 M⁻¹cm⁻¹ como o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e então, a atividade da CAT foi expressa em U/mL, conforme a equação abaixo:

$$\text{Atividade da CAT (U/mL)} = \frac{\Delta \text{ de absorbância da amostra}}{0,071} \times 10 \times \text{diluições}$$

.....

Para a análise desta enzima, diluiu-se a amostra de lisado de papa de hemácias em 50 vezes.

Após calcular-se a atividade da enzima em U/mL, o resultado foi convertido em U/g Hb da amostra a partir do seguinte cálculo:

$$\text{Atividade da CAT (U/g Hb)} = \frac{\text{atividade da CAT (U/mL)}}{[\text{Hb da amostra}]} \times 100$$

3.3.5.4 Quantificação das enzimas antioxidantes SOD e GPx nos eritrócitos

A avaliação da SOD e GPx presente nos eritrócitos foi realizada seguindo os mesmos protocolos aplicados ao LA e descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.3 deste capítulo.

Para a análise da GPx, o lisado de papa de hemácias foi diluído em 100 vezes, enquanto que na leitura da SOD a diluição da amostra foi 50 vezes.

Após calcular-se a atividade das enzimas em U/mL, o resultado foi convertido em U/g Hb seguindo o mesmo cálculo proposto para a CAT.

3.3.6 Avaliação radiográfica torácica neonatal

A avaliação radiográfica dos pulmões é fundamental para o diagnóstico diferencial das diversas afecções pulmonares multietiológicas e utilizada rotineiramente em UTIs neonatais humanas. Deve-se atentar que imagens radiográficas do tórax de filhotes apresentam aumento de opacidade intersticial generalizada, por haver menor volume de ar presente nos alvéolos (SILVA, 2008).

Por este motivo, sugere-se que a imagem radiográfica torácica seja utilizada como ferramenta diagnóstica adjuvante às avaliações clínica e hemogasométrica na detecção de hipóxia moderada a severa e edema pulmonar grave, assim como na avaliação da absorção dos fluidos fetais pulmonares e expansão alveolar imediatas ao nascimento (SILVA, 2008). Em Medicina Veterinária, o estudo radiográfico dos pulmões de neonatos ovinos, com o intuito de estabelecer o diagnóstico diferencial de afecções pulmonares não é realizado frequentemente, o que limita a escolha da conduta terapêutica a ser instituída.

Neste experimento, a análise radiográfica torácica foi sempre efetuada a partir de duas projeções radiográficas: latero-laterais esquerda e direita, no intervalo entre 0 e 10 minutos de vida e após 24 horas do nascimento. Utilizou-se o aparelho radiográfico POSKON[®], modelo Pxp 20 HS Plus de 20 mA e 100 kV e filme radiográfico 30 x 40 cm T-MAT G/RA film (Kodak[®]). O intervalo de radiação aplicado esteve entre 70 e 100 kV / 0,8 e 1,6 mAs, em 100 cm de distância entre o foco emissor e o filme de raio X (RX). Para o processamento das radiografias foram utilizados o revelador e fixador Kodak[®] em câmara escura. As imagens obtidas foram descritas segundo o grau de opacidade do parênquima nos diferentes lobos pulmonares, classificado em intenso (3), moderado (2), suave (1) ou discreto (1/2) e, ainda, presença de broncogramas aéreos e padrão de visibilização do parênquima em intersticial ou alveolar. Objetivou-se avaliar a evolução da absorção dos fluidos pulmonares dos distintos grupos. Novamente, nesta etapa experimental, o avaliador das imagens radiográficas desconhecia os grupos e momentos delineados, evitando-se assim, qualquer parcialidade nos resultados.

3.3.7 Oximetria de pulso

A oximetria de pulso é uma técnica desenvolvida para mensurar o percentil de Hb(O₂) de forma contínua e não invasiva. Para este propósito, baseia-se nos princípios da pletismografia e espectrofotometria (EAST; COLDITZ, 2007). Através

.....

da emissão de ondas infra-vermelhas sobre os vasos sanguíneos, o percentual de saturação é calculado pela diferença na quantidade de luz absorvida pela Hb e Hb(O₂) (NIJLAND et al., 2000). Quando há elevado consumo tecidual de O₂ ou a captação pulmonar deste gás é ineficiente ocorre a dessaturação, com a conversão da Hb(O₂) em Hb e a maior oferta de O₂ plasmático circulante. Há muitos fatores que elevam a afinidade da Hb pelo O₂, como por exemplo, a Hb dos fetos em comparação aos adultos, a hipotermia e alcalose (MARGOTTO, 2010). E em contraposição, a hipertermia e a acidose diminuem tal afinidade (MARGOTTO, 2010). Sob circunstâncias normais, estas variantes trabalham para o benefício fisiológico do organismo. Por exemplo, com o alto metabolismo dos tecidos dos neonatos, há maior produção de moléculas de hidrogênio (H⁺) e dióxido de carbono (CO₂), estas acidificam o meio e acarretam menor afinidade da Hb pelo O₂, disponibilizando-o aos tecidos. Todavia, quando há hipóxia intensa, este mecanismo não funciona corretamente, comprometendo severamente a evolução neonatal (MARGOTTO, 2010). A saturometria do O₂ possui duas vantagens sobre o monitoramento da frequência cardíaca fetal. Ao medir a proporção de Hb(O₂), é possível fazer inferência direta do estado de oxigenação tecidual. Ainda, deve-se ressaltar que é uma técnica segura, confiável e cuja tecnologia é relativamente acessível (SOUSA; AMORIM; 2008).

O valor fisiológico mínimo de saturação de O₂ (SO₂) pode ser definido como aquele em que o equilíbrio ácido-básico sanguíneo é mantido; e abaixo do qual há o desenvolvimento de acidose metabólica e mau ajustamento neonatal (DILDY, 2007). Em Medicina Humana, valores desejáveis de SO₂ pré-ductais variam com o tempo pós-natal, mantendo-se, aos 5 minutos de vida, entre 70 e 80%; aos 5 a 10 minutos do nascimento, entre 80 e 90% e após este período, acima de 90% (BRANCO; GUINSBURG, 2011).

Para os neonatos do presente estudo, foi procedida avaliação da oximetria de pulso aos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos e 2, 4, 6 e 24 horas de vida, por meio do oxímetro neonatal Oximax N85[®] (Nellcor, EUA) acoplado ao sensor Max-Fast[®] (Nellcor, EUA), aplicado à face interna da coxa, sob a topografia da artéria femoral.

.....

3.3.8 Avaliação histopatológica dos pulmões

Com o óbito neonatal, os cordeiros foram submetidos à necropsia e à lobectomia pulmonar, por incisão torácica. Os pulmões foram lavados com solução fisiológica para remoção da secreção serossanguínea presente e foram removidos fragmentos de cada um dos lobos: cranial e caudal do pulmão direito e, cranial, médio e caudal do pulmão esquerdo.

Os lobos pulmonares foram seccionados em fragmentos de 1 cm³ e armazenados em solução de metacarn (Anexo B) a temperatura ambiente, durante 12 horas. Após este período, foram transferidos para solução de álcool a 70 %, até o processamento. Os fragmentos pulmonares dos lobos cranial e caudal direitos foram inclusos em parafina, seccionados em cortes histológicos de 0,5 µm, desparafinizados e rehidratados seguindo protocolo padrão. Foram, então, contra-corados em hematoxilina e eosina (HE) e avaliados em microscopia óptica, com aumento de 10 a 100 vezes, quanto a parâmetros histomorfológicos. Avaliou-se a presença de edema, congestão, hemorragia, hemociderose, macrófagos alveolares, monócitos, grau de expansão do parênquima, presença de neutrófilos e espessamento de parede. Alterações em tais variáveis foram classificadas em: ausente (0), leve (1), moderada (2), intensa (3), muito intensa (4).

Com a intenção precípua de analisar acuradamente os efeitos da ventilação e terapia com surfactante aos quais os neonatos experimentais foram submetidos, os lobos pulmonares cranial e caudal direitos de 3 cordeiros nascidos aos 135 dias de gestação, pela via vaginal, porém não subjugados à ventilação e terapia com surfactante exógeno, foram manipulados à semelhança dos supracitados e avaliados segundo as mesmas variáveis. Na expressão dos resultados, os referidos neonatos irão compor o grupo controle (CON).

3.4 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do programa SAS System for Windows (SAS, 2000). O efeito dos grupos experimentais, momentos de avaliação, bem como a interação entre tais fatores, foi estimado pelo PROC GLM. De acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição Gaussiana) e homogeneidade das variâncias, as diferenças entre tratamentos foram analisadas por meio de testes paramétricos (PROC GLM para cada fator isoladamente ou LSD para fatores combinados) e não-paramétricos (Wilcoxon). Sempre que necessário, os dados foram transformados com o objetivo de obedecer a premissas estatísticas.

Para os casos de interações significativas, o efeito do tratamento (grupos experimentais) foi analisado agrupando-se todos os momentos de avaliação. Igualmente, a avaliação nos diferentes momentos foi comparada combinando-se todos os grupos; caso contrário, as comparações estatísticas foram realizadas levando-se em consideração ambos os efeitos (tratamento e tempo).

As diferenças entre tratamentos foram analisadas utilizando o PROC NPAR1WAY para análise de variância não paramétrica. O tratamento foi verificado pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste Wilcoxon para múltiplas comparações. As

.....

variáveis classificatórias foram: grupos (CON, VEN, SURF1, SURF2 e SURF3) e tempos de avaliação (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos e 2, 4, 6 e 24 horas). As variáveis respostas foram: dados do Escore Apgar, temperatura corpórea, hemogasometria, glicemia, lactatemia, uréia e creatinina sérica, concentração das TBARS e enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD, radiografia torácica, oximetria de pulso e histopatologia pulmonar. As variáveis também foram submetidas à análise de correlação de Pearson.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância adotado é de 5%, ou seja, as diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para as variáveis respostas foram consideradas quando $p < 0,05$.

3.6 VALORES DE REFERÊNCIA

O quadro 2 descreve os parâmetros adotados como referência neste estudo.

Quadro 2 – Valores de referência adotados para as variáveis estudadas no período entre o nascimento e as 24 horas de vida de neonatos ovinos. São Paulo, 2012

Parâmetro (unidade)	Valor	Amostra	Referência
Escore Apgar	8,0 ± 2,0	neonato ovino	Rodrigues et al., 2007
FC – 1 dia de vida	203 ± 43,22	neonato ovino	Lima et al., 2010
FR – 1 dia de vida	86 ± 37,17	neonato ovino	Lima et al., 2010
Temp. (°C)	39,0 – 40,1	neonato ovino	Rodrigues et al., 2007
Glicemia (mg/dL)	19,4 a 68,8	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
pH	7,20 a 7,40	neonato ovino	Rodrigues et al., 2007
pO ₂ (mmHg) – 1h pós natal	46,0 ± 11,8	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
pCO ₂ (mmHg) – 1h pós natal	45,2 ± 4,7	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	23,88 ± 2,17	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
BE (mmol/L)	(-)4,00 – 4,00	neonato bovino	Rodrigues, 2008
TCO ₂ (mmol/L)	24,0 ± 1,98	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
SpO ₂ (%)	59,83 ± 10,85	neonato bovino	Feitosa et al., 2011
Na ⁺ (mmol/L)	147,5 ± 1,51	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
K ⁺ (mmol/L)	4,2 ± 0,61	neonato ovino	Vannucchi et al., prelo
Oxi. (%)	> 70	neonato bovino	Nijland et al., 1996
Uréia (mg/dL)	29,1 ± 11,6	neonato bovino	Feitosa et al., 2009
Creatinina (mg/dL) – 1 dia de vida	1,69 ± 0,35	neonato bovino	Vaala et al., 2006
Lactato (mmol/L) - 2h pós-natal	< 4 mmol/L	neonato ovino	Comline e Silver, 1971

Resultados

4 RESULTADOS

Neste capítulo, os resultados numéricos serão expostos sob a forma de média e desvio padrão. Para as seguintes variáveis-resposta tempo de vida, temperatura corpórea, irritabilidade reflexa e concentração de lactato sérico, houve interação entre os grupos experimentais e momentos de avaliação (Tabela 1). Sendo assim, tais resultados estão expostos discriminando-se os efeitos principais Grupo e Momento de avaliação. As demais variáveis mensuradas em mais de um momento, serão expressas discriminando-se o efeito do grupo (com a união de todos os momentos de avaliação), ou ainda, considerando-se o efeito do tempo (com a união de todos os grupos)

Tabela 1 – Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais Grupos (SURF1 vs. SURF2 vs. SURF3 vs VEN) e Momentos de avaliação (0 vs. 5 vs. 10 vs. 20 vs. 30 vs. 40 vs. 50 vs. 60 vs. 70 vs. 80 vs. 90 min vs. 2 vs. 4 vs. 6 vs. 24h) e sua interação para a avaliação clínica neonatal - São Paulo, 2012

	GRUPOS	MOMENTOS	GRUPO X MOMENTO
Escore Apgar	< 0,0001	< 0,0004	0,2172
Frequência Cardíaca	< 0,0001	< 0,0001	0,4281
Padrão Respiratório	< 0,0001	0,0367	0,9016
Irritabilidade Reflexa	< 0,0001	0,0661	0,0010
Tônus muscular	< 0,0001	0,0615	0,9576
Mucosas aparentes	0,0001	0,3059	0,5393
Temperatura Corpórea	< 0,0001	< 0,0001	0,0033
Oximetria de pulso	< 0,0001	0,2884	0,9627
Glicemia	0,0499	0,0010	0,1173
Lactatemia	< 0,0001	0,1376	0,0021

4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

No tocante à idade gestacional, ao intervalo entre indução do parto e expulsão fetal e ao peso dos cordeiros ao nascimento não houve diferença estatística entre os grupos. Em média, o nascimento ocorreu $49,81 \pm 4,88$ horas após a primeira aplicação do aglepristone (Alizin[®], Virbac), aos $135,4 \pm 0,3$ dias de gestação e os cordeiros apresentaram $2,14 \pm 0,11$ kg. A tabela 2 expõe a composição dos grupos com relação ao gênero e ao tempo de sobrevivência dos neonatos. A sobrevivência neonatal foi significativamente superior no grupo VEN em relação ao SURF1 e SURF3. Três neonatos, sendo dois do grupo VEN e um do grupo SURF2 viveram por período superior a 7 dias, porém, como o período experimental restringiu-se à primeira semana de vida, foram-lhes atribuídas 168 horas (7 dias) de vida, para o cálculo do tempo de sobrevivência neonatal.

Tabela 2 – Composição dos grupos experimentais VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 com relação ao gênero e ao tempo de sobrevivência em horas (média $\pm$ DP) dos neonatos - São Paulo, 2012

Gênero e tempo de sobrevivência neonatal (em horas)							
VEN		SURF1		SURF2		SURF3	
macho	10,1 h	macho	1,77 h	fêmea	20,8 h	fêmea	11,17 h
macho	72 h	macho	4,6 h	fêmea	8,7 h	fêmea	2,65 h
fêmea	37,12 h	macho	2,4 h	fêmea	168 h	fêmea	2,02 h
fêmea	168 h	macho	2,77 h	macho	10,68 h	fêmea	4,08 h
fêmea	168 h	macho	2,78 h	macho	3,12 h	fêmea	8,18 h
-	-	-	-	macho	2,37 h	macho	2,8 h
Média	91,04 ^A	Média	2,86 ^B	Média	35,61 ^{AB}	Média	5,2 ^B
DP	$\pm 73,6^A$	DP	$\pm 1,05^B$	DP	$\pm 65,2^{AB}$	DP	$\pm 3,7^B$

^{A,B} indicam diferença estatística entre grupos ($p < 0,05$).

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os neonatos pertencentes ao grupo VEN obtiveram melhor condição clínica quando comparados aos demais grupos, com resultado de escore Apgar significativamente superior durante o período experimental (Figura 2). Os recém-nascidos do grupo SURF1 não atingiram o escore mínimo ideal para a espécie ao nascimento, permanecendo com nota inferior a 6,0. Os demais grupos, SURF2 e SURF3, mantiveram-se limítrofes a este valor referencial.

Figura 2 – Escore Apgar médio (média $\pm$ DP) nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3)

A,B indicam diferença estatística entre grupos ($p < 0,0001$).

A figura 3 mostra a evolução da temperatura corpórea nos grupos e momentos estudados. É possível observar hipotermia ($< 39,0^{\circ}\text{C}$) ao longo do primeiro dia de vida, em todos os grupos, a partir dos 5 minutos pós-natais. A queda

mais acentuada está entre os 20 e 90 minutos do nascimento, à exceção do grupo SURF3, que não apresentou significativas variações na temperatura corpórea neonatal. Neonatos do grupo SURF1 apresentaram temperatura corpórea significativamente inferior aos demais aos 80 e 90 minutos e às 3 e 4 horas do nascimento. Vale ressaltar que, a evidente queda observada nestes dois últimos momentos de avaliação citados é referente ao único neonato pertencente ao grupo, o qual veio a óbito com 4,6 horas do nascimento.

Figura 3 – Temperatura corpórea média nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3); aos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas após o nascimento

A tabela 3 expõe os valores médios de FC e FR, bem como as notas Apgar atribuídas ao padrão de auscultação, ao longo do primeiro dia de vida, para os grupos estudados. Com relação à FC e nota da FC, é possível notar que o grupo VEN apresentou valores significativamente superiores aos demais, ou seja, os batimentos do coração foram mais rítmicos e vigorosos. Em contraposição, o grupo

SURF1, manteve-se bradicárdico no período estudado e o padrão de FC significativamente inferior. Logo, houve mais arritmias e menor contratilidade do miocárdio. No tocante à avaliação respiratória, não houve diferenças de FR entre os grupos, porém é possível notar que o grupo VEN apresentou melhor qualidade no padrão respiratório avaliado à ausculta dos campos pulmonares.

Tabela 3 – Média e desvios padrão da FC (bpm), FR (mrpm), nota da FR (0 a 2) e nota do padrão respiratório (0 a 2) dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 - São Paulo - 2012

GRUPOS	FC (bpm)	Nota da FC	FR (mrpm)	Nota do padrão respiratório
VEN	204 ± 4,54 ^A	1,62 ± 0,05 ^A	63 ± 1,70 ^A	1,34 ± 0,05 ^A
SURF1	159 ± 4,89 ^C	1,08 ± 0,04 ^C	57 ± 2,06 ^A	1,12 ± 0,04 ^B
SURF2	182 ± 4,05 ^B	1,39 ± 0,53 ^B	62 ± 2,02 ^A	1,08 ± 0,03 ^B
SURF3	184 ± 4,64 ^B	1,36 ± 0,05 ^B	61 ± 2,38 ^A	1,01 ± 0,03 ^B

^{A,B} indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

A figura 4 exhibe as variações de irritabilidade reflexa ao longo do primeiro dia de vida para os grupos pesquisados. Aos 60 a 90 minutos e ainda, 2 e 4 horas, os neonatos do grupo SURF1 obtiveram respostas ao estímulo irritativo significativamente menores que os demais. Ainda, pode-se notar, para os grupos SURF 1 e 3 a evidente queda nos últimos valores de irritabilidade expostos, mensurados momentos antes do óbito neonatal.

Figura 4 – Irritabilidade reflexa média nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3) aos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas após o nascimento

Ao avaliarem-se as variáveis tônus muscular e coloração de mucosas, é possível salientar que, novamente, o grupo SURF1 obteve os piores resultados. O tônus muscular foi significativamente mais flácido ($0,9 \pm 0,06$) que os demais grupos e a coloração das mucosas aparentes esteve significativamente mais alterada (cianótica e/ou pálida), em comparação aos neonatos SURF2 e VEN ($1,3 \pm 0,06$; $1,66 \pm 0,05$; $1,62 \pm 0,05$, respectivamente). Ademais, o grupo VEN obteve, dentre todos os grupos, nota de tônus muscular significativamente superior ($1,45 \pm 0,06$).

Todos os grupos estudados apresentaram avaliação satúrométrica média superior à referência adotada ($> 70\%$), em oximetria de pulso, como exposto na figura 5. Todavia, o grupo SURF1 obteve resultado inferior aos demais grupos avaliados.

Figura 5 – Oximetria de pulso média (%) nos grupos ventilação (VEN), surfactante 1 (SURF1), surfactante 2 (SURF2) e surfactante 3 (SURF3)

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística ($p < 0,0001$).

Todos os neonatos apresentaram hiperlactatemia entre as 2 e 24 horas pós-natais (Tabela 4). Na comparação entre grupos, é possível verificar que em comparação ao grupo VEN, o grupo SURF1 foi significativamente superior as 2 e 4 horas, assim como o foi o grupo SURF3, às 4 horas do nascimento. Nas avaliações entre 6 e 24 horas do parto, não houve diferenças significativas entre os grupos, VEN, SURF2 e SURF3.

Tabela 4 – Média e desvios padrão da concentração sérica de lactato (mmol/L) dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3, às 0, 2, 4, 6 e 24 horas do nascimento. - São Paulo - 2012

GRUPOS	0 hora	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
VEN	6,6 ± 2,0 ^{A,b}	5,8 ± 2,3 ^{A,b}	6,1 ± 1,4 ^{A,b}	6,9 ± 1,9 ^{A,a}	4,2 ± 0,9 ^{A,a}
SURF1	7,9 ± 0,6 ^{B,ab}	12,8 ± 4,1 ^{AB,a}	18,7 ± 0,0 ^{A,a}	*	*
SURF2	8,1 ± 1,4 ^{A,a}	8,8 ± 3,2 ^{AB,ab}	7,3 ± 1,7 ^{AB,ab}	8,3 ± 0,8 ^{A,a}	4,3 ± 0,0 ^{B,a}
SURF3	8,6 ± 1,5 ^{A,a}	8,2 ± 3,4 ^{A,ab}	10,0 ± 4,8 ^{A,a}	6,0 ± 0,6 ^{A,a}	*

A,B entre momentos, no mesmo grupo de avaliação significam diferença estatística ($p < 0,0001$).

a,b entre grupos, no mesmo momento de avaliação significam diferença estatística ($p < 0,05$).

* significa ausência de mensuração por óbito neonatal.

Com relação à glicemia sanguínea, não houve diferença entre grupos, de modo que, todos os resultados mantiveram-se no intervalo fisiológico adotado (Tabela 5). Ainda, ao considerar-se o efeito do tempo, verificou-se que neonatos ovinos apresentam, às 24 horas do nascimento ($83,4 \pm 16,78$ mg/dL), glicemia sanguínea superior aos demais momentos avaliados ($29,3 \pm 2,92$ mg/dL - 0 hora; $29,6 \pm 3,93$ mg/dL - 2 horas e $50,7 \pm 13,53$ mg/dL - 6 horas).

Os valores médios de uréia e creatinina séricas estão dispostos na tabela 5. Para ambas as variáveis, não houve diferença estatística entre grupos. Porém, a concentração de uréia foi maior ao intervalo referencial em todos os grupos analisados. Ao considerar-se o efeito do tempo, cordeiros prematuros apresentaram às 24 horas do nascimento, valor de uréia ($71,6 \pm 4,4$ mg/dL) significativamente superior às 4 e 6 horas ($49,5 \pm 4,3$ e $50,6 \pm 3,45$ mg/dL, respectivamente). Contudo, houve valores de creatinina significativamente mais baixos ($0,88 \pm 0,0$ mg/dL) às 24 horas pós-natais em comparação aos demais momentos estudados.

Tabela 5 – Média e desvios padrão das variáveis séricas glicemia (mg/dL), uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL), dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 - São Paulo - 2012

GRUPOS	VEN	SURF1	SURF2	SURF3
Glicemia (mg/dL)	49,78 ± 10,4 ^A	37,0 ± 7,71 ^A	36,11 ± 3,72 ^A	24,85 ± 2,90 ^A
Uréia (mg/dL)	49,8 ± 3,7 ^A	49,5 ± 7,4 ^A	55,3 ± 2,9 ^A	57,8 ± 4,3 ^A
Creatinina (mg/dL)	1,54 ± 0,10 ^A	1,71 ± 0,08 ^A	1,74 ± 0,06 ^A	1,64 ± 0,09 ^A

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.3 AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA ARTERIAL

Não houve interação estatística entre as variáveis hemogasométricas estudadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais Grupos (SURF1 vs. SURF2 vs. SURF3 vs VEN) e Momentos de avaliação (0 vs. 2 vs. 4 vs. 6 vs. 24h) e sua interação para a avaliação hemogasométrica neonatal - São Paulo - 2012

	GRUPOS	MOMENTOS	GRUPO X MOMENTO
pH	0,0018	< 0,0001	0,1375
PCO ₂	0,2387	0,0004	0,1676
PO ₂	0,0005	< 0,0001	0,2072
SO ₂	0,0005	0,0004	0,1914
HCO ₃ ⁻	0,2206	0,6649	0,3359
TCO ₂	0,4012	0,4409	0,3089
BE	0,0194	0,9372	0,2032
Na ²⁺	0,7473	0,3401	0,9424
K ⁺	0,3516	0,8948	0,9471

A tabela 7 explicita os valores das principais variáveis hemogasométricas estudadas. O grupo SURF1 apresentou acidemia (pH < 7,20), com média de pH significativamente inferior ao grupo VEN.

Com relação à pressão parcial de O₂, todos os indivíduos apresentaram valores inferiores à referência (46,0 ± 11,8 mmHg). Porém, é possível observar que no grupo SURF1, a hipoxemia foi muito mais intensa, com nível significativamente inferior ao do grupo VEN. Todavia, no tocante à pCO₂, houve hipercapnia para todos os grupos, porém, sem diferença estatística entre eles.

Tabela 7 – Média e desvios padrão das variáveis hemogasométricas pH, pO₂ (mmHg), pCO₂ (mmHg), TCO₂ (mmol/L), HCO₃⁻ (mmol/L), BE (mmol/L) e SpO₂ (%), dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 - São Paulo - 2012

GRUPOS	VEN	SURF1	SURF2	SURF3
pH	7,28 ± 0,02 ^A	7,09 ± 0,07 ^B	7,2 ± 0,03 ^{AB}	7,21 ± 0,03 ^{AB}
pO₂ (mmHg)	31,0 ± 3,8 ^A	12,1 ± 1,5 ^B	21,5 ± 2,2 ^{AB}	22,2 ± 3,7 ^{AB}
pCO₂ (mmHg)	51,6 ± 2,8 ^A	58,3 ± 5,0 ^A	57,5 ± 5,8 ^A	65,3 ± 9,4 ^A
TCO₂ (mmol/L)	25,2 ± 0,8 ^A	22,2 ± 2,9 ^A	23,1 ± 1,0 ^A	22,8 ± 1,5 ^A
HCO₃⁻ (mmol/L)	23,8 ± 0,7 ^A	20,5 ± 2,8 ^A	21,3 ± 0,9 ^A	21,1 ± 1,3 ^A
BE (mmol/L)	-2,6 ± 0,8 ^A	-9,4 ± 3,8 ^B	-6,5 ± 0,8 ^{AB}	-6,6 ± 1,3 ^{AB}
SpO₂ (%)	42,0 ± 5,9 ^A	10,0 ± 2,0 ^B	30,0 ± 4,7 ^{AB}	27,0 ± 5,4 ^{AB}

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística (p < 0,05).

Apesar da hipercapnia relatada, os valores de dióxido de carbono total no sangue (TCO₂) estiveram dentro do intervalo de referência em todos os grupos estudados. Por sua vez, os íons bicarbonato, principais tamponantes sanguíneos e responsáveis por neutralizar os íons H⁺ na acidose, foram igualmente reduzidos em todos os grupos avaliados.

O BE auxilia no diagnóstico de distúrbios ácido-básicos de origem não-respiratória e avalia o excesso ou déficit de bases no sangue. Para os grupos SURF1, SURF2 e SURF3, os valores de BE arterial estiveram abaixo dos valores limítrofes referenciais (- 4) e, em particular ao grupo SURF1, tal valor foi significativamente inferior ao grupo VEN.

A saturação sanguínea associada a outras variáveis hemogasométricas, como a pO₂, pode contribuir para a avaliação global da perfusão tecidual. Em todos os grupos avaliados, os valores de SpO₂ foram marcadamente inferiores,

corroborando os valores de pO_2 arterial supracitados. Ainda, a hipoxemia diagnosticada foi significativamente superior nos neonatos SURF1 em comparação ao VEN, com valores de SpO_2 marcadamente diminutos.

A tabela 8 apresenta as concentrações plasmáticas dos íons Na^+ e K^+ . Não houve evidentes alterações para ambos os íons em nenhum dos grupos estudados. Houve hiponatremia para todos os grupos estudados e hipercalemia para o grupo SURF1, porém sem diferença significativa em relação aos demais.

Tabela 8 – Média e desvios padrão das concentrações plasmáticas dos íons Na^+ (mmol/L) e K^+ (mmol/L), dos neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3. - São Paulo - 2012

GRUPOS	Na^+ (mmol/L)	K^+ (mmol/L)
VEN	$143 \pm 0,99^A$	$4,6 \pm 0,34^A$
SURF1	$144 \pm 0,90^A$	$5,4 \pm 0,47^A$
SURF2	$142 \pm 1,80^A$	$4,4 \pm 0,29^A$
SURF3	$142 \pm 0,90^A$	$4,6 \pm 0,26^A$

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO NEONATAL

4.4.1 Quantificação de TBARS, GPx e SOD no LA

Não houve diferença estatística nas concentrações de TBARS e das enzimas GPx e SOD analisadas no LA dos grupos estudados e os resultados estão discriminados na tabela 9.

Tabela 9 – Média e desvios padrão das concentrações de TBARS, glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) no líquido amniótico (LA) dos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 - São Paulo - 2012

Perfil oxidativo do líquido amniótico (LA) de cordeiros prematuros				
GRUPOS	VEN	SURF1	SURF2	SURF3
TBARS (ng/mL)	175,3 ± 9,7 ^A	652,6 ± 362,4 ^A	385,8 ± 45,9 ^A	418,9 ± 55,1 ^A
GPx (U/mL)	0,15 ± 0,02 ^A	0,16 ± 0,02 ^A	0,13 ± 0,01 ^A	0,14 ± 0,02 ^A
SOD (U/mL)	0,09 ± 0,03 ^A	0,10 ± 0,05 ^A	0,11 ± 0,06 ^A	0,20 ± 0,02 ^A

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.4.2 Quantificação das TBARS no soro e das enzimas CAT, GPx e SOD na papa de hemácias

A tabela 10 exibe os resultados das TBARS mensuradas no soro; GPx, CAT e SOD avaliadas na papa de hemácias. Não houve interação entre grupos e momentos de avaliação. Neonatos do grupo SURF2 apresentaram valor de CAT significativamente superior ao SURF1.

Tabela 10 – Média e desvios padrão das concentrações de TBARS em soro, glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) na papa de hemácias de neonatos pertencentes aos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3. - São Paulo - 2012

Perfil oxidativo neonatal sanguíneo em cordeiros prematuros				
GRUPOS	VEN	SURF1	SURF2	SURF3
TBARS (ng/mL)	175,3 ± 9,7 ^A	169,1 ± 6,6 ^A	167,1 ± 5,5 ^A	166,7 ± 6,5 ^A
GPx (U/g Hb)	375,8 ± 30,5 ^A	331,5 ± 66,3 ^A	419,3 ± 28,4 ^A	397,4 ± 24,4 ^A
CAT (U/g Hb)	815,8 ± 122,1 ^{AB}	381,4 ± 102,8 ^B	994,6 ± 163,5 ^A	779,0 ± 177,2 ^{AB}
SOD (U/g Hb)	52,4 ± 8,7 ^A	71,9 ± 13,0 ^A	80,0 ± 10,4 ^A	73,6 ± 14,0 ^A

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística (p < 0,05).

4.5 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PULMONAR

Para a avaliação estatística das imagens radiográficas pulmonares, foram utilizados somente os dados referentes às avaliações imediatas ao nascimento, pois às 24 horas pós-natais, foi possível radiografar apenas três neonatos, todos pertencentes ao grupo VEN. Sendo assim, a avaliação deste segundo momento, será realizada de forma descritiva, baseando-se nos mesmos critérios de avaliação adotados.

Não houve diferença estatística quanto ao grau de opacidade do parênquima pulmonar nas projeções LLE e LLD, imediatas ao nascimento, entre todos os grupos estudados. Todavia, considerando-se o efeito do tempo de avaliação, é possível salientar que, 41,6% dos neonatos apresentaram opacidade pulmonar intensa e homogênea, 47,2% obtiveram opacidade moderada, com a presença de broncogramas aéreos e somente em 11,2% a opacidade pulmonar foi discreta, seguida de padrão radiográfico intersticial (Figura 6).

Figura 6 – Grau de opacidade (1 a 3) do parênquima pulmonar às avaliações radiográficas látero-laterais direita e esquerda em cordeiros prematuros, imediatamente ao nascimento. Grau 1: leve, grau 2: moderada e difusa e grau 3: intensa e difusa

A avaliação radiográfica do tórax mostrou, ainda, que ao nascimento, 23,5% (4/17) dos neonatos apresentaram total indefinição da silhueta cardíaca; em 47,1% (8/17) deles, o rebordo cardíaco pode ser visibilizado parcialmente; e, somente em 29,4% (5/17), tal visibilização foi completa (Figura 7). Em complementação, o bordo diafragmático foi indefinível em 17,6% dos recém-nascidos (3/17), parcialmente visto em 35,3% (6/17) e completamente definido em 47,1% (8/17) dos animais estudados (Figura 8).

Figura 7 – Grau de visibilização da silhueta cardíaca às avaliações radiográficas látero-laterais direita e esquerda em cordeiros prematuros, imediatamente ao nascimento

Figura 8 - Imagens radiográficas torácicas de neonatos ovinos prematuros, imediatamente ao nascimento. **A-** projeção LLD: indefinição de silhueta cardíaca e bordo diafragmático, aumento intenso e generalizado de radiopacidade, não visibilização de ramificação brônquica. **B-** projeção LLE: parcial definição de silhueta cardíaca, completa definição de bordo diafragmático, aumento moderado de radiopacidade, localizado em lobos caudais, presença evidente de broncogramas aéreos

A avaliação radiográfica após 24 horas de vida denota melhora progressiva do grau de opacidade pulmonar em dois dos três neonatos avaliados, com padrão pulmonar intersticial, discreta opacificação do parênquima, total definição de silhueta cardíaca e bordo diafragmático (figura 9A). No terceiro neonato avaliado, houve piora do quadro radiográfico pulmonar, com opacificação intensa, parênquima heterogêneo e parcial definição da silhueta cardíaca (figura 9B). Este neonato veio à óbito 13 horas após a avaliação radiográfica descrita.

Figura 9 - Imagens radiográficas torácicas de neonatos ovinos prematuros, 24 horas após o nascimento. **A-** projeção LLE: padrão pulmonar intersticial e discreta opacificação do parênquima tecidual, definição da silhueta cardíaca e bordos diafragmáticos **B-** projeção LLD: parcial definição de silhueta cardíaca e bordo diafragmático, aumento intenso de radiopacidade, com parênquima heterogêneo e alguns broncogramas aéreos

4.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES

Não foi observada diferença estatística entre os grupos para as seguintes variáveis: presença de edema, congestão, hemorragia e hemociderose em ambos os lobos; e, ainda, presença de monócitos, grau de expansão do parênquima, presença de neutrófilos e espessamento de parede alveolar em lobos craniais.

A tabela 11 expõe as variações significativas entre grupos, encontradas na avaliação dos lobos caudais. A presença de monócitos teciduais foi significativamente maior para o grupo SURF2 em comparação à CON, VEN e SURF1, enquanto a presença de neutrófilos foi mais intensa no grupo SURF3, em relação à CON e VEN. Ademais, houve espessamento da parede alveolar nos grupos VEN, SURF2 e SURF3.

Tabela 11 – Avaliação histopatológica em lobo pulmonar caudal direito dos grupos CON, VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 para a presença de monócitos teciduais, grau de expansão do parênquima pulmonar, presença de neutrófilos e grau de espessamento da parede alveolar, classificadas de 0 a 4, conforme intensidade de ocorrência. - São Paulo - 2012

Avaliação histopatológica do lobo pulmonar caudal direito					
GRUPOS	CON	VEN	SURF1	SURF2	SURF3
Monócitos	0,0 ± 0,0 ^C	0,0 ± 0,0 ^C	0,6 ± 0,55 ^{BC}	1,4 ± 0,55 ^A	0,8 ± 0,41 ^{AB}
Expansão do parênquima	1,3 ± 0,34 ^A	1,5 ± 0,5 ^A	1,2 ± 0,4 ^A	1,0 ± 0,6 ^A	2,2 ± 0,5 ^A
Neutrófilos	0,3 ± 0,58 ^B	0,0 ± 0,0 ^B	0,4 ± 0,55 ^{AB}	0,8 ± 0,45 ^{AB}	1,2 ± 0,98 ^A
Espessamento de parede	0,7 ± 0,58 ^B	2,0 ± 0,0 ^A	1,6 ± 0,55 ^{AB}	2,0 ± 0,71 ^A	2,7 ± 1,03 ^A

^{A,B} entre grupos significam diferença estatística (p < 0,05).

Embora sem diferença significativa entre os grupos, cabe descrever algumas alterações importantes. O grau de expansão do parênquima pulmonar foi marcadamente irregular para todos os grupos estudados. Sendo assim, é possível observar áreas de atelectasia adjacentes àquelas em que houve expansão alveolar (Figura 10A). A figura 10B evidencia a presença de alvéolos e sáculos,

caracterizando o desenvolvimento pulmonar aos 135 dias de gestação como transicional entre as fases sacular e alveolar.

Figura 10 – Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, nascidos aos 135 dias de gestação coradas em HE **A-** 10X, expansão irregular do parênquima, com áreas de atelectasia e expansão alveolar separadas por septo (seta). **B-** 20X, presença de alvéolos expandidos (a) e compactados (AC), sáculo e parede inter-sacular (seta)

Neonatos do grupo VEN apresentaram intensa irregularidade no grau de expansão alveolar entre lobos craniais e caudais. Ainda, foi observado enfisema pulmonar e hiperexpansão de ductos e alvéolos pulmonares (Figura 11).

Figura 11 – Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, pertencentes ao grupo VEN coradas em HE **A-** áreas de hiperexpansão alveolar e ductal e enfisema alveolar (seta) em lobo cranial. **B-** discreta distensão do parênquima pulmonar em lobo caudal

.....

Foi observado edema discreto a moderado em neonatos dos grupos VEN, SURF1, SURF2 e SURF3 (Figura 12A). Este pode ser caracterizado como edema de origem inflamatória, devido ao padrão granuloso e proteináceo do infiltrado alveolar, especialmente nos neonatos submetidos à ventilação. Ademais, em todos os grupos ventilados, foi possível identificar a congestão tecidual moderada a grave (Figura 12B) e infiltrado neutrofílico leve a severo, especialmente nos lobos craniais (Figura 13).

Figura 12 – Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, nascidos aos 135 dias de gestação coradas em HE **A-** lobo cranial com edema difuso e moderado (e), expansão alveolar irregular e congestão (seta). **B-** presença de distensão septal com conteúdo fibrinoso (f) e vasos congestionados (setas) pelo parênquima

Figura 13 – Fotomicrografias de pulmão de neonatos ovinos prematuros, nascidos aos 135 dias de gestação coradas em HE **A-** reação inflamatória intensa, com infiltrado neutrofílico em bronquíolos e alvéolos **B-** presença de conteúdo fibrinoso em alvéolos e moderada quantidade de células inflamatórias dispersas pelo parênquima

Por fim, a imagem 14 mostra um quadro de bronquite e bronquiolite associadas à pleuro-pneumonia supurativa difusa marcada bacteriana apresentada por um animal pertencente ao grupo SURF3.

Figura 14 – Fotomicrografias de pulmão de neonato pertencente ao grupo SURF3 coradas em HE **A**- reação inflamatória intensa, com infiltrado neutrofílico em bronquíolos e alvéolos **B**- presença de colônia bacteriana em parênquima pulmonar (seta)

4.7 TESTES DE CORRELAÇÃO

Nas condições deste estudo, o tempo de vida neonatal pode ser correlacionado positivamente ao tônus muscular e negativamente ao lactato sérico (Tabela 12).

Foi estabelecida correlação positiva entre as variáveis clínicas escore Apgar, FC, PR, IR e TM. Somente o escore Apgar, TM e IR correlacionaram-se positivamente à temperatura corpórea, juntamente à oximetria, HCO_3^- e BE (Tabela 12).

Com relação às variáveis hemogasométricas, os valores de pH, pO_2 e SpO_2 correlacionaram-se positivamente a todas as variáveis clínicas e à oximetria. Os íons bicarbonato e o BE correlacionaram-se positivamente entre si e também, com escore Apgar, IR, TM, temperatura corpórea e oximetria (Tabela 12).

Os valores de lactato sérico correlacionaram-se negativamente com todas as variáveis clínicas e hemogasométricas, à exceção da pCO_2 , cuja correlação foi

.....

positiva. Houve, ainda, correlação negativa entre $p\text{CO}_2$, escore Apgar, FC e PR (Tabela 12).

Não houve correlação entre os valores de TBARS, SOD, CAT e GPx avaliados no LA e na papa de hemácias. Todavia, foi possível correlacionar as variáveis oximetria de pulso e lactato sérico com SOD, GPx e CAT (Tabela 13).

Tabela 12 - Coeficiente de correlação e de significância das variáveis tempo de vida, escore Apgar, FC, PR, TM, IR, temperatura corpórea (Temp), oximetria (Oxi), lactato sérico, pH, pCO₂, pO₂, HCO₃⁻, BE, SpO₂, para todos os neonatos estudados. - São Paulo – 2012

[illegible]

Tabela 13 Coeficiente de correlação e de significância das variáveis escore Apgar, pH, oximetria de pulso (oximetria), lactato sérico, TBARS, GPx, SOD e CAT. – São Paulo - 2012

[illegible]

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 SOBREVIDA E VITALIDADE NEONATAL

Neste estudo, a sobrevivência neonatal foi significativamente maior para o grupo VEN em comparação aos grupos SURF1 e SURF3. Este resultado contrapõe-se a muitos estudos publicados, nos quais a terapia com surfactante associada a distintos modelos ventilatórios mostra-se positiva e necessária à sobrevivência do neonato prematuro (VAN KAAM, 2011; DANI et al., 2011). Porém, não há estudos em literatura corrente, que avaliem a eficácia da terapia com surfactante associada à ventilação manual com balão auto-inflável, sendo este um trabalho pioneiro para a Neonatologia Veterinária.

É de comum conhecimento na espécie humana, que os andrógenos fetais circulantes diminuem a síntese do surfactante e retardam o desenvolvimento estrutural pulmonar. De tal modo, pacientes prematuros do gênero masculino estão sob maior risco de desenvolver a SDR (BEPPU, 1998). Miller et al. (2009) não encontraram correlação entre viabilidade neonatal e gênero de cordeiros nascidos a termo. Todavia, De Matteo et al. (2010) atestaram maior sobrevivência de neonatos ovinos do gênero feminino nascidos aos 131 dias de gestação, após indução de parto com epostane e glicocorticóides. Corroborando os resultados de De Matteo et al. (2010), no presente trabalho, os três neonatos sobreviventes ao final do período experimental eram fêmeas. Ademais, o grupo SURF1 foi completamente composto por cordeiros machos, o que justificaria parcialmente o pior desempenho pós-natal. Porém, o grupo SURF3, formado por 5 fêmeas e apenas 1 macho, apresentou a mesma sobrevivência neonatal do que o grupo SURF1. Sendo assim, é possível inferir que os diferentes protocolos de administração do surfactante adotados neste experimento influenciaram diretamente o período de sobrevivência pós-natal, independentemente do gênero neonatal.

Valores adequados de escore Apgar no período neonatal imediato variam dentre as espécies domésticas. Em potros, a higidez neonatal é comprovada apenas quando o escore Apgar é superior a 9; enquanto escores entre 6 e 8 indicam asfixia

.....

moderada, porém com bom prognóstico (VAALA et al., 2006). Por sua vez, Rodrigues (2008) encontrou valores próximos a 06, imediatamente ao nascimento, em bezerros holandeses nascidos em eutocia. Ainda, em cães, filhotes hígidos nascidos via vaginal devem apresentar escore Apgar superior a 07 ao nascimento (SILVA et al., 2008). Alguns autores sugerem que o escore Apgar não apresenta sensibilidade suficiente para diferenciar o comprometimento neonatal menos evidente (YEOMANS, 1985; BENESI, 1992). Em acórdância aos referidos autores, não houve correlação entre o escore Apgar e tempo de vida neonatal. Entretanto, neste experimento, houve correlação positiva entre tônus muscular e tempo de vida. Ademais, já está comprovado que o sistema de pontuação Apgar pode ser seguramente correlacionado ao equilíbrio ácido-básico nos recém-nascidos (BENESI, 1992; SILVA, 2008; RODRIGUES, 2008).

Os neonatos pertencentes ao grupo VEN obtiveram melhor condição clínica quando comparados aos demais grupos, com resultado de escore Apgar significativamente superior. Ainda neste período, recém-nascidos do grupo SURF1 não atingiram o escore mínimo ideal ao nascimento, permanecendo com nota inferior a 6,0. Estes resultados vão parcialmente ao encontro de citações prévias, em que cordeiros nascidos em eutocia e a termo apresentam escore Apgar médio próximo a 6 ao nascimento e alcançam valores entre 7 e 9 ao longo dos primeiros 15 minutos pós-natal (BOVINO et al., 2010; VANNUCCHI et al., prelo). Com isso, é possível afirmar que a prematuridade na espécie ovina, acarreta a diminuição da vitalidade clínica ao nascimento e retardo em sua evolução.

O aparelho circulatório neonatal é caracterizado por volume sanguíneo, pressão e resistência vascular periférica baixos. Deste modo, para que a perfusão sanguínea periférica seja ideal é necessário manter a frequência e o débito cardíacos elevados e promover a estabilização do volume plasmático e a pressão venosa central (ADELMAN; WRIGHT, 1985). À exceção do grupo VEN, todos os neonatos submetidos à terapia com surfactante apresentaram bradicardia e menores notas para FC, especialmente para o grupo SURF1. Neste período de vida, o controle neurológico do aparelho cardiovascular é parcial, pois a atividade nervosa simpática do miocárdio é incompleta. Deste modo, episódios de bradicardia não derivam de estímulo vagal e, sim, de hipoxemia prolongada (GRUNDY, 2006), corroborando a correlação positiva entre FC e oximetria de pulso. Sendo assim, é

.....

possível creditar o menor desempenho cardio-circulatório nos grupos tratados à estase do surfactante exógeno nas vias aéreas, prejudicando sobremaneira a troca gasosa pulmonar, especialmente quando o volume instilado ocorreu em dose única. Adas, Albuquerque e Zucchi (2005) atestam que, em crianças, o surfactante exógeno mistura-se ao endógeno, compondo o pool de secreção, reciclagem e catabolismo, logo após 2 horas da aplicação. Todavia, há situações em que o surfactante exógeno é mal distribuído e não inserido nas vias metabólicas necessárias para manter a atividade de superfície, dentre as quais citam-se: hipertensão pulmonar persistente, doença pulmonar restritiva, baixa concentração do medicamento por diluição em edema, sequestro dentro de membranas hialinas ou espaços atelectásicos, dentre outros (ADAS; ALBUQUERQUE; ZUCCHI, 2005). Em Medicina Humana, a ventilação manual com balão auto-inflável é aplicada em salas de parto, na reanimação imediata do neonato bradicárdico, contudo, ao instituir-se o tratamento com surfactante, outras modalidades ventilatórias, mais eficientes e menos deletérias, são adotadas. Neste experimento, optou-se por ventilar cordeiros prematuros com balão auto-inflável na tentativa de estabelecer um protocolo assistencial compatível com a realidade aplicada à Medicina Veterinária em espécies de produção. Todavia, é factível inferir que a modalidade ventilatória adotada não contribuiu para a adequada ação do surfactante.

O neonato é suscetível à relativa hipoxemia por imaturidade dos barorreceptores de O₂ sanguíneo, constituição mais flexível da parede torácica, menor diâmetro e rigidez das vias aéreas traqueobrônquicas, discreta capacidade de expansão alveolar e por elevado requerimento metabólico de O₂ (GRUNDY; 2006; MEYER, 2007). A resposta à hipoxemia é caracterizada por taquipnéia transitória com padrão ventilatório superficial seguida de bradipneia, arfadas e apneia (MEYER, 2007). Neste experimento, não houve diferença significativa nos valores de FR entre os grupos, pois na maior parte das aferições os neonatos encontravam-se em ventilação assistida, com FR controlada em 60 mrm. Entretanto, é possível observar que neonatos do grupo VEN apresentaram melhor padrão respiratório, com menor ocorrência de sibilos e estertores à auscultação pulmonar. Tal observação corrobora a hipótese enunciada de que houve falha parcial ou completa do alastramento do surfactante exógeno. Ainda, ressalta-se a possibilidade da instilação do surfactante

.....

associado à ventilação manual ter induzido alterações pulmonares, como inflamação e barotraumas, culminando com a depressão do quadro clínico apresentado.

A manutenção da temperatura corpórea pode ser alcançada pelo aumento da atividade metabólica, representada pela capacidade de tremor e pelo controle vascular, com redução do fluxo sanguíneo para as extremidades e pele (BATCHELDER et al., 2007). Além destes, os neonatos possuem um mecanismo singular de termorregulação corpórea, por meio da produção de calor a partir da oxidação do tecido adiposo marrom de localização peri-renal e inter-escapular (LANDIM-ALVARENGA, 2006). Os adipócitos deste particular tecido possuem gotas lipídicas multifocais que os distinguem do tecido adiposo branco, além da maior concentração de mitocôndrias e vasos sanguíneos (CARSTENS, 1994). Todavia, este precioso tecido representa apenas 2,0 a 4,5% do peso corpóreo de cordeiros recém-nascidos (NOWAK; POIDRON, 2006) e naqueles com baixo peso ao nascimento, as reservas de gordura são ainda mais escassas (SYKES, 1982). Tais assertivas justificam o comportamento térmico dos grupos estudados. Foi possível observar hipotermia ao longo do primeiro dia de vida, com queda superior a 4 °C em todos os grupos a partir dos 5 minutos pós-natais. A queda mais acentuada esteve entre os 20 e 90 minutos do nascimento e os neonatos do grupo SURF1 apresentaram temperatura corpórea significativamente inferior aos demais aos 80 e 90 minutos e às 3 e 4 horas do nascimento. Estes dados corroboram parcialmente Nowak e Poidron (2006), os quais verificaram queda de somente 1 a 2 °C na temperatura corporal de cordeiros, durante os primeiros 15 minutos de vida. Para compensar essa perda térmica, os cordeiros devem elevar seu metabolismo em, no mínimo, 15 vezes ao do período pré-parto (ALEXANDER; WILLIAMS, 1968). A despeito da necessidade de manutenção da temperatura corporal em neonatos, Ball et al. (2009) atestaram menor dano pulmonar da ventilação mecânica não protetora em cordeiros prematuros hipotérmicos, devido à inflamação pulmonar menos intensa e à maior estabilidade clínica e gasométrica durante a ventilação. Contrariamente, neste estudo, a temperatura corpórea correlacionou-se positivamente com escore Apgar, oximetria de pulso, concentração de bicarbonato sanguíneo e valor de BE, indicando menor comprometimento metabólico quanto melhor é a homeostase térmica. Tanto a variável tônus muscular (TM), como irritabilidade reflexa (IR), exprimem o grau de depressão do sistema nervoso central do neonato (FEITOSA,

.....

2008) e, em nosso estudo, a variável TM correlacionou-se positivamente com a sobrevivência neonatal. Amiúde, neonatos do grupo SURF1 apresentaram resultados inferiores aos demais, enquanto que neonatos do grupo VEN obtiveram maior TM. Neonatos hígidos devem apresentar mucosas de coloração rósea intensa (SPRENG, 2004). Quando cianóticas, sinalizam severa hipoxemia e palidez, hipoperfusão ou anemia (FEITOSA, 2008). Todavia, Silva et al. (2008), observaram que a inspeção das mucosas aparentes mostrou ser uma variável pouco fidedigna na identificação de neonatos caninos com graus leves de alterações cardiorrespiratórias e do equilíbrio ácido-básico. Os resultados deste experimento corroboram tal assertiva, pois não houve diferença significativa na coloração de mucosas aparentes entre os grupos os grupos VEN, SURF2 e SURF3, porém, a oximetria de pulso foi superior no grupo VEN, em relação aos demais grupos tratados.

5.2 OXIMETRIA DE PULSO NEONATAL

A oximetria de pulso é o método não invasivo de mensuração da oxigenação sanguínea e com isso, é possível que seja realizada com maior frequência, garantindo a melhor precisão na avaliação e detecção precoce de alterações.

Para que haja maior afinidade com o O_2 , a molécula de Hb sofre uma alteração estrutural. Em consequência, o padrão de absorbância ótica desta difere em relação à Hb adulta e a acurácia da oximetria de pulso pode ser negligenciada (MENDELSON; KENT, 1989). Outros fatores também interferem com a real mensuração da SO_2 , por exemplo, a maioria das dishemoglobinas superestima a saturação avaliada, pois estas reagem com a luz incidida, apesar de não carregarem o O_2 (ZIJLSTRA et al., 1991). Ademais, pode-se citar alterações de hematócrito, o local anatômico de aplicação do sensor, substâncias na interface sensor-tecido, tais como LA e mecônio, pelos, pigmentação e influências externas (REUSS, 2004).

No presente estudo, a oximetria de pulso média ao longo do primeiro dia de vida foi significativamente maior no grupo VEN em comparação aos demais. Todavia, para todos os grupos estudados, os valores aferidos foram superiores à

.....

referência adotada (70%). Em Medicina Humana, valores de SpO₂ pré-ductais aceitáveis variam de acordo com o tempo pós-nascimento, de modo que até os 5 minutos de vida, aceitam-se valores entre 70 e 80%, nos próximos 5 minutos, valores entre 80 e 90% e após 10 minutos de vida, a oximetria de pulso deve permanecer entre 85 e 95% (ALMEIDA; GUINSBURG, 2011).

A oximetria de pulso correlacionou-se positivamente com escore Apgar total e as variáveis clínicas que o compõe, temperatura corpórea, as variáveis hemogasométricas HCO₃⁻ e BE e ainda, houve correlação negativa com lactato sanguíneo. Destarte, essa variável mostrou-se de fundamental importância para a acurada avaliação clínica e metabólica neonatal. Entretanto, até o presente momento, não há em Medicina Veterinária valores referenciais adequados para a oximetria de pulso no período neonatal, pois apesar de todos os grupos apresentarem valores acima do mínimo adotado, muitos neonatos evoluíram para o óbito. Sendo assim, são necessários estudos aprofundados sobre a oximetria de pulso na espécie ovina, a fim de que sejam estabelecidos parâmetros ideais para período neonatal imediato.

5.3 GLICEMIA, LACTATEMIA E FUNÇÃO RENAL

A mortalidade peri-natal é o maior fator contribuinte às perdas reprodutivas na espécie ovina e elevadas taxas de sobrevivência podem estar correlacionadas à maior maturidade metabólica ao nascimento (GREENWOOD et al., 2002).

As glândulas adrenais secretam corticosteróides como resposta à acidemia e hipóxia no momento do parto (MASSIP, 1980). Os glicocorticóides e as catecolaminas são hormônios responsivos ao estresse e estimulam diretamente o metabolismo hepático de carboidratos, como a glicose (CHAN et al., 1993). Massip, em 1980, verificou que bezerros submetidos ao estresse do parto assistido, hipoxemia intra-parto ou baixas temperaturas ambientais apresentaram altas concentrações de glicose. Por sua vez, Rodrigues (2008) não encontrou hiperglicemia em bezerros nascidos a termo, independente do tipo de parto, todavia, a glicemia daqueles oriundos de distocias foi significativamente superior ao

.....

nascimento. Para Lúcio (2008), neonatos caninos advindos de distocias apresentam hiperglicemia ao nascimento e após 1 hora de vida. No presente experimento, não houve diferença estatística na média das avaliações glicêmicas realizadas, de modo que todos os grupos tangenciaram o limite inferior do intervalo fisiológico adotado (tabela 6). Ainda, ao considerar-se o efeito do tempo, verificou-se elevação da glicemia após 24 horas de vida, devido à ingestão do colostro. Miller et al. (2009) reportaram menores níveis de glicose plasmática em cordeiros com peso corpóreo inferior a 3,25 kg ou temperatura retal superior a 35,4 °C, correlacionando-os à menor expectativa de vida após 72 horas pós-natal.

A concentração do lactato sanguíneo é precipuamente influenciada pelo equilíbrio de seu metabolismo, de modo que a hiperlactatemia caracteriza-se pelo aumento na produção e/ou diminuição no consumo do substrato (RONCO, 2005). Nas situações de hipóxia, há redução da captação de lactato pelo fígado, além de adicionalmente poder se tornar produtor do metabólito (SOUZA; ELIAS, 2006). O surgimento da acidose láctica tipo A, ou hipóxica, está relacionado ao desequilíbrio entre oferta e consumo de O₂, presente nas disfunções cardiorrespiratórias (HUGHES, 2006). Neste estudo, todos os neonatos apresentaram hiperlactatemia entre as 2 e 24 horas pós-natais. Em Neonatologia Humana, Shah et al. (2004) correlacionaram valores de lactato sérico à gravidade da hipóxia perinatal e índice de mortalidade. Tal estudo corrobora os achados do corrente trabalho, pois houve correlação negativa entre lactato sérico e tempo de sobrevivência neonatal e ainda, deste com as variáveis hemogasométricas pH, pO₂, HCO₃⁻, BE, SO₂ e oximetria de pulso.

Ademais, é possível verificar que o grupo SURF1 apresentou lactato sérico significativamente superior ao grupo VEN às 2 e 4 horas e, na avaliação temporal deste grupo, houve significativo aumento ao longo das primeiras 4 horas de vida. Com base neste resultado, é possível hipotetizar que, devido ao maior volume de surfactante instilado nos neonatos do grupo SURF1, a área de troca gasosa pulmonar remanescente foi menor em comparação aos demais, predispondo-os ao desenvolvimento mais intenso do metabolismo anaeróbico. Estes resultados vão ao encontro das citações de Groppetti et al. (2010), para os quais, neonatos caninos com maiores concentrações de lactato sérico, avaliado em amostra sanguínea do cordão umbilical, obtiveram menores notas de escore Apgar e maior risco de óbito

.....

às 48 horas. Neste experimento, houve correlação negativa entre o lactato sérico e as variáveis clínicas do escore Apgar, FC, PR, TM e IR.

A acidose láctica possui ação depressora direta sobre a contratilidade e débito cardíacos que, no animal adulto, pode ser compensada pela estimulação simpática do miocárdio por aumento da FC (ROBERTSON, 1989). Entretanto, Grundy (2006) afirmou que este mecanismo compensatório é ineficiente em neonatos, em razão do incompleto desenvolvimento do sistema simpático. Como resultado, o coração é incapaz de aumentar sua força contração e o débito cardíaco depende principalmente da frequência de contração do miocárdio. Tal efeito cronotrópico negativo pode ser observado nos grupos SURF1, 2 e 3, que apresentaram diminuição da FC e elevação do lactato sérico quando acareados ao grupo VEN.

Nas circunstâncias de hipóxia, há redistribuição do fluxo sanguíneo, com privilégio para a circulação cerebral, cardíaca e adrenal, em detrimento a demais órgãos, como rins e intestinos (VAALA; HOUSE, 2002). Tal realocamento circulatório resulta, com frequência, em diminuição da perfusão renal e necrose tubular aguda, acarretando aumento das concentrações séricas de creatinina e desbalanços eletrolíticos, como hipocalcemia, hipocloremia e hiponatremia (VAALA; HOUSE, 2002). Ashraf et al. (2011) encontraram valores significativamente superiores de uréia, creatinina e ácido úrico séricos em crianças sob asfixia perinatal. Contrariamente, não houve, em nosso experimento, elevação dos níveis séricos de creatinina a despeito da hipóxia encontrada. Sabe-se, todavia, que na dinâmica do equilíbrio ácido-básico, a influência renal acarreta alterações mais tardias, porém definitivas (ANDRADE; HIRSCHHEIMER, 2005). Ademais, são necessários no mínimo dois terços de néfrons afuncionais para que os níveis de creatinina ultrapassem o intervalo fisiológico (CARLSON, 2002), o que pode justificar os níveis de creatinina sérica fisiológicos nos cordeiros do presente estudo. Segundo Forterre, Raila e Schweigert. (2004), os exames primários mais indicados para avaliação da função renal são a uréia e creatinina séricas, não obstante, afirmam que a uréia não é um indicador inteiramente específico da lesão renal. Neste estudo, a concentração de uréia foi maior ao intervalo referencial em todos os grupos analisados. Ainda, na avaliação temporal, houve elevação dos níveis urêmicos às 24 horas do nascimento, corroborando Feitosa et al. (2009), em estudo com bezerros holandeses e mestiços. Situações de privação, processos que resultem em rápido catabolismo tecidual, ou

.....

ainda, hipovolemia e desidratação podem levar ao discreto aumento da uréia plasmática (CARLSON, 2002).

5.4 EQUILÍBRIO ÁCIDO-BÁSICO NEONATAL

O pH sanguíneo é mantido em valores fisiológicos devido a integração de processos de tamponamento químico intra e extra-celulares, associados aos mecanismos reguladores fisiológicos renais e pulmonares. Os tampões intra e extra-celulares são os primeiros combatentes na defesa do equilíbrio ácido-básico, seguidos pelo sistema respiratório e, por fim, o renal (ANDRADE; HIRSCHHEIMER, 2005). Os distúrbios ácido-básicos envolvem primariamente a diminuição ou aumento anormais das bases tampões do sangue, incluindo o HCO_3^- , os fosfatos, as proteínas e a hemoglobina e caracterizam-se por acidose e alcalose metabólicas, respectivamente (SWENSON; REECE, 1996; ANDRADE; HIRSCHHEIMER, 2005). No presente estudo, somente o grupo SURF1 apresentou acidemia, com valor médio de pH significativamente inferior ao grupo VEN, contrariando estudos prévios, que evidenciam acidose em cordeiros prematuros (DANI et al., 2009).

Na homeostase ácido-básica, a principal função dos pulmões é a manutenção em níveis constantes da concentração de ácido carbônico arterial (CO_2), através da excreção deste ácido na mesma proporção de sua produção tecidual (ANDRADE; HIRSCHHEIMER, 2005). Os distúrbios ácido-básicos que envolvem primeiramente o aumento ou diminuição do CO_2 seriam provocados por alterações respiratórias, acarretando acidose ou alcalose respiratórias (HOUP, 1996). Houve moderada hipercapnia em todos os grupos estudados, parcialmente justificada pelo pior padrão respiratório à auscultação pulmonar apresentado pelos grupos SURF1, 2 e 3, pois houve correlação negativa entre pCO_2 e as variáveis clínicas score Apgar, FC e PR. Sabe-se que cordeiros prematuros são bastante tolerantes à hipercapnia e filhotes ventilados durante 6 horas, com pCO_2 de 95 mmHg e pO_2 fisiológica apresentam menor grau de injúria pulmonar (STRAND; IKEGAMI; JOBE, 2003). Destarte, é possível inferir que a gravidade do desequilíbrio não está precipuamente relacionada à hipercapnia, mas sim à hipóxia que a acompanha.

.....

A pO_2 sanguínea sofre influência da concentração de oxigênio inspirado e da frequência respiratória do recém-nascido (VAALA et al., 2006), observação ratificada pela correlação positiva entre pO_2 e as variáveis do escore Apgar, como PR. Todos os neonatos apresentaram hipoxemia nos momentos estudados, indicando severo comprometimento da atividade aeróbica e desencadeamento do metabolismo anaeróbico, com produção de ácido láctico tecidual. É possível inferir que, aliado à prematuridade, o tratamento proposto e o modelo ventilatório aplicados contribuíram para o mau ajustamento pulmonar, com falha na captação de O_2 e eliminação de CO_2 . A SpO_2 é dependente de muitos fatores, entre eles pO_2 , temperatura sanguínea, pH e hemoglobinas disfuncionais (DAY, 2002). Assim como a oximetria de pulso e a pO_2 , neste experimento, houve diminuição significativa da SpO_2 aferida no grupo SURF1, em relação ao VEN.

Os distúrbios ácido-básicos de origem não-respiratória devem ser avaliados por meio do déficit ou excesso de bases (BE) e da concentração de íons HCO_3^- (RUSSEL, HANSEN, STEVENS, 1996). Ao longo do primeiro dia de vida, houve discreta depleção dos estoques de HCO_3^- . Ainda, houve diminuição abaixo dos valores referenciais de BE nos grupos SURF 1, 2 e 3, sendo que para o grupo SURF1 houve diminuição significativa em relação ao VEN. Distúrbios respiratórios e metabólicos primários podem coexistir, originando os desbalanços mistos (CARLSON, 2002). Nos distúrbios simples, as variações da pCO_2 e HCO_3^- sempre caminham na mesma direção (CARLSON, 2002; ANDRADE; HIRSCHHEIMER, 2005). Logo, as situações em que há elevação da pCO_2 , conjunta à depleção do HCO_3^- , como observado neste experimento, caracterizam distúrbios mistos. À exceção do grupo SURF1, o pH manteve-se dentro da normalidade, indicando a tentativa compensação do desbalanço ácido-básico.

Os mecanismos para atingir o equilíbrio ácido-básico e eletrolítico nos recém-nascidos são peculiares, pois diferenças significativas na metabolização e função renal em relação aos adultos são verificadas. Em condições de acidose, os íons H^+ são trocados pelos íons sódio e potássio intra-celulares, aumentando suas concentrações no sangue (ROBINSON, 2004). Estes íons, juntamente com o cloro, são os principais eletrólitos do organismo; e quaisquer desbalanços podem ocasionar convulsões, choque, dentre outras anormalidade metabólicas (BASSU et al., 2010). Em estudos com crianças em asfixia perinatal, Basu et al. (2010)

.....

encontraram hiponatremia, hipocalcemia e hipercalemia diretamente proporcional ao grau de asfixia e ainda, houve correlação com escore Apgar aos 5 minutos, sendo negativa com potássio e positiva com cálcio e sódio. Tais assertivas corroboram os resultados do presente experimento, em que houve hiponatremia e hipercalemia para o grupo SURF1.

Cabe ressaltar que, os neonatos que apresentaram maiores desbalanços ácido-básicos e incapacidade em atingir a homeostasia, vieram à óbito previamente aos demais. Logo, as comparações entre os momentos de avaliação, houve maior participação dos recém-nascidos mais exitosos e que sobreviveram por mais tempo.

5.5 PERFIL OXIDATIVO PERINATAL

Estudos demonstram que no período final da gestação, há elevação superior a 150% nas concentrações das enzimas SOD, GPx, CAT e glutathione redutase, paralelamente à maturação funcional dos pulmões (DAVIS; AUTEN, 2010). Ademais ao aumento intra-eritrocitário, a expressão das enzimas antioxidantes eleva-se em muitos compartimentos fetais e na placenta com a evolução da gestação e como consequência, há diminuição da peroxidação lipídica (FRANK; GROSECLOSE, 1984; QANUNGO; MUKHERJEA, 2000).

Os marcadores de estresse oxidativo e as enzimas antioxidantes foram pesquisados no líquido amniótico de mulheres grávidas hípidas, ou com complicações gestacionais, dentre elas hipertensão arterial, diabetes gestacional e infecções vaginais (BOGAVAC et al., 2011). Foi possível identificar concentrações muito distintas de MDA nos dois grupos estudados. Porém, as enzimas xantina-oxidase e SOD foram detectadas em níveis muito baixos, para ambos os grupos. Por fim, a enzima GPx e a substância GSH foram detectadas, com concentrações variáveis. Tais autores concluíram que o uso do LA para identificação de marcadores de estresse oxidativo foi limitado, principalmente devido à grande variação de volume total do LA e contaminação com sangue (BOGAVAC et al., 2011). No corrente experimento, a colheita do LA foi realizada ainda no período intra-parto, quando há a protrusão da vesícula amniótica íntegra pelo canal vaginal,

.....

com isso, as TBARS e enzimas no LA avaliam o perfil oxidativo fetal até o momento da colheita, antes da instilação do surfactante, o que justifica não haver diferenças estatísticas entre os grupos, para todas as variáveis mensuradas. Corroborando Gobavac et al. (2011), as concentrações de SOD no LA foram diminutas, colocando em questão a viabilidade do LA para avaliação desta enzima. Todavia, futuros estudos com a quantificação das TBARS e enzimas antioxidantes no LA de ovelhas em diferentes fases da gestação se fazem necessários para que haja melhor entendimento da maturação antioxidante feto-neonatal na espécie.

Inder et al. (1994), em seu estudo com recém-nascidos pré-termos de baixo peso, documentaram maior produção de radicais livres por meio da produção mais elevada de produtos da peroxidação lipídica. A elevação nos níveis de TBARS também foi documentada em neonatos humanos portadores da SDR (ZOEREN-GROBBEN et al., 1997). No presente estudo, as concentrações de TBARS em soro não diferiram nos todos os grupos avaliados. Não há trabalhos reportados em literatura que quantifiquem a peroxidação lipídica e as enzimas antioxidantes em cordeiros hígidos ou portadores da SDR, nascidos em diferentes idades gestacionais.

Atualmente, o meio biológico de eleição para a pesquisa de enzimas antioxidantes é o citosol intra-celular de hemácias (VENTO et al., 2003). Em fetos humanos, durante o período de transição feto-neonatal e no período pós parto imediato, há elevação na atividade de todas as enzimas que compõem a reação de oxi-redução da glutathione, principalmente as GPx e glutathione transferase (VENTO et al., 2003). No período pós-natal, Nassi et al. (2009) observaram, entre 2 e 20 dias de vida, significativo aumento da GPx e SOD eritrocitárias em neonatos termos, quando comparados à prematuros tardios. No presente trabalho, não houve diferença significativa entre grupos na avaliação das enzimas SOD e GPx, ao longo do primeiro dia de vida.

Todavia, no atual estudo, foi possível observar elevação significativa do nível eritrocitário de CAT para o grupo SURF2 em relação ao SURF1. Dizdar et al. (2011) relataram maior capacidade antioxidante total em soro de crianças prematuras diagnosticadas com SDR e tratadas com 200 mg/kg de surfactante porcino, atribuindo esse incremento no arsenal antioxidante dos neonatos à elevação nas

.....

concentrações de SOD e CAT. Contrariamente, não houve, em nosso estudo, diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo VEN.

O surfactante pulmonar possui em sua composição fisiológica elevadas concentrações de SOD e catalase, sugerindo que as enzimas antioxidantes previnem a peroxidação lipídica e inativação do surfactante (MATALON et al., 1990). Em contraste, os surfactantes comerciais possuem baixas concentrações de tais enzimas (DAVIS; AUTEN, 2010). Dani et al., (2009) avaliaram o estresse oxidativo pulmonar de cordeiros prematuros submetidos à terapia com surfactante porcino e beclometasona e ventilados durante as primeiras 6 horas de vida. Como resultados, observaram que o tratamento associativo acarretou menor estresse oxidativo e inflamação do parênquima pulmonar e melhor desempenho respiratório neonatal. Em consonância, nosso trabalho demonstrou correlação positiva entre as enzimas CAT e SOD e a variável oximetria de pulso, indicando melhor oxigenação em neonatos com maior atividade antioxidante. Disto demonstra, habilidade dos neonatos prematuros em reverter o estresse oxidativo quando a exposição ao oxigênio aumenta no período neonatal. Ainda, houve correlação positiva entre GPx e lactato sérico, indicando que na presença do metabolismo anaeróbico, há menor consumo enzimático possivelmente por menor produção de radicais livres de O₂.

5.6 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PULMONAR

A avaliação radiográfica dos pulmões é ferramenta muito importante no diagnóstico das afecções pulmonares neonatais, porém é necessário conhecer algumas particularidades inerentes a este período. No período fetal, o pulmão é repleto de fluídos, os quais devem ser rapidamente absorvidos permitindo as trocas gasosas ao nascimento. Sendo assim, as imagens radiográficas do tórax de filhotes apresentam aumento de opacidade intersticial generalizada, por haver menor volume de ar presente nos alvéolos (SILVA, 2008). O mecanismo de absorção do líquido pulmonar (*clearance* pulmonar) inicia-se ao final da gestação e segue no

.....

período pós-natal. Falhas em tal processo, como por exemplo, a deficiência de surfactante nos indivíduos prematuros, podem limitar a entrada de ar e a expansão pulmonar. Tais assertivas corroboram os achados radiográficos deste estudo, no qual, imediatamente ao nascimento, 88,8% dos neonatos apresentaram aumento moderado a intenso da radiopacidade do parênquima pulmonar, aliado a 70,6% dos neonatos com visibilização parcial ou ausente da silhueta cardíaca.

Em Medicina Humana, as imagens radiográficas da SDR leve demonstram broncogramas leves, na SDR moderada estes alcançam a periferia do pulmão e na SDR grave ocorre opacificação total dos campos pulmonares, sendo a silhueta cardíaca pouco perceptível (ADAS; ALBUQUERQUE; ZUCCHI, 2005). Shimada et al. (1990) observaram que 4,5% dos neonatos babuíños portadores da SDR e submetidos à terapia com surfactante bovino apresentaram enfisema intersticial pulmonar, comparado a 34,6% para o grupo não tratado. Ademais, para o grupo tratado, o clareamento radiográfico ocorreu aproximadamente 18 a 20 horas prévias à melhora da complacência pulmonar. Por sua vez, Bick et al. (1992), ao avaliarem imagens radiográficas torácicas de crianças portadoras da SDR e submetidas à terapia com surfactante, atestaram melhor aeração pulmonar, uniforme ou irregular e significativa correlação com a diminuição do requerimento de oxigênio exógeno. Em nosso estudo, somente filhotes pertencentes ao grupo VEM foram radiografados após 24 horas do nascimento. Destes, as imagens correspondentes a 2 neonatos exibiram padrão radiográfico intersticial, com discreta opacificação do parênquima, total definição de silhueta cardíaca e bordo diafragmático, indicando adequada expansão pulmonar e preenchimento de alvéolos com ar. A terceira avaliação indicou piora do quadro radiográfico pulmonar, com opacificação intensa, parênquima heterogêneo e parcial definição da silhueta cardíaca. Tal avaliação correspondeu ao neonato que veio à óbito após algumas horas, indicando o grave comprometimento respiratório apresentado. Desta maneira, é possível inferir que, assim como na Medicina Humana, a radiografia torácica pode ser uma ferramenta sensível na avaliação da resposta terapêutica ao tratamento com surfactante. Todavia, para tal comprovação, futuras pesquisas devem ser delineadas.

5.7 HISTOPATOLOGIA PULMONAR

Em Medicina Humana, o ponto crítico para o sucesso da reanimação pulmonar é a adequada ventilação, de modo que na presença de apnéia, ventilação irregular ou bradicardia, a assistência ventilatória deve iniciar-se nos primeiros 60 segundos de vida (ALMEIDA; GUINSBURG, 2011). Esta assistência pode ser realizada com o balão auto-inflável, cujas vantagens são o fácil manuseio e independência de fonte de gás. Em contraposição, não é possível fornecer um pico de pressão inspiratória (PIP) constante, oferta de oxigênio em concentrações intermediárias, ou ainda, administrar pressão expiratória final positiva (PEEP) confiável (ALMEIDA; GUINSBURG, 2011). Ademais, a ventilação com pressão positiva deve ser cuidadosamente controlada, pois acarreta injúrias pulmonares, tais como barotraumas, volutraumas, atelectraumas e, ainda, biotraumas, quando há inflamação ou infecção do parênquima pulmonar (SCHMÖLZER et al., 2008).

Bjorklung et al. (1997) avaliaram cordeiros prematuros submetidos à 6 profundas manobras ventilatórias com balão auto-inflável, cuja válvula regulatória de pressão estava desativada, e o volume de ar instilado foi de 35 a 40 mL/kg. Nestes, a terapia com surfactante porcino administrado aos 30 minutos do nascimento foi pouco exitosa, devido ao volutrauma causado, com pneumotórax, áreas de hiperexpansão localizadas, atelectasia e edema. Em nosso experimento, foi aplicada ventilação manual durante 2 horas, na presença da válvula regulatória e manômetro de pressão, de modo que o volume de ar instilado estimado fosse próximo a 10 a 13 mL/kg (GROSSMANN; NILSSON; ROBERTSON, 1986) e PIP entre 30 e 40 cm H₂O. Tal controle garantiu a não ocorrência de pneumotórax, todavia, houve hiperexpansão, atelectasia e edema nos animais ventilados, igualmente verificado por Bjorklung et al. (1997). Ademais, o modelo ventilatório aplicado no presente estudo foi desprovido de PEEP, permitindo, com isso, sucessivas expansões e colapsos das vias aéreas e alvéolos, o que acarretou atelectrauma em distintos graus (MUSCEDERE et al., 1994), justificando a reação inflamatória presente.

Em macacos prematuros, a capacidade pulmonar total é reduzida devido ao edema proteináceo generalizado (JACKSON et al., 1990), semelhante àquele

.....

encontrado em todos os grupos do presente experimento. Situação semelhante foi observada em cães prematuros não ventilados (REGAZZI, 2011), contudo, é severamente agravado pela ventilação assistida, pois esta induz à lesão do epitélio alveolar (SCHMÖLZER et al., 2008).

Houve, ainda, maior presença de monócitos teciduais para o grupo SURF2 em comparação ao CON, VEN e SURF1 e concentração mais intensa de neutrófilos no grupo SURF3, em relação ao CON e VEN. Tais achados vão de encontro a diversos estudos reportados, para os quais a terapia com surfactante inibiu a reação inflamatória pulmonar, principalmente por facilitar a mecânica respiratória, com o recrutamento de alvéolos atelectásicos, melhor complacência pulmonar e oxigenação (SATO et al., 2010; DANI et al., 2011). É possível inferir que o modo ventilatório adotado não permitiu a correta adsorção do surfactante pelo parênquima pulmonar, com isso, permaneceu acumulado nas vias aéreas condutoras, culminando no agravamento do desempenho respiratório, piora da mecânica pulmonar e, conseqüentemente, maior inflamação local.

Ademais, quando presentes, os neutrófilos ativados por citocinas e demais mediadores inflamatórios produzem radicais livres de O₂, os quais danificam o parênquima pulmonar, ao estimular a atividade da collagenase e, em última análise, a destruição da matriz extracelular (SCHOCK et al., 2001). Dani et al. (2011) comprovaram a associação direta entre a inflamação pulmonar e estresse oxidativo local em cordeiros prematuros tratados com beclometasona e surfactante e submetidos à ventilação controlada durante 6 horas. No presente trabalho, não houve relação entre os antioxidantes sanguíneos e o grau de inflamação pulmonar. Doravante, fazem-se necessários estudos aprofundados entre inflamação pulmonar e desencadeamento do estresse oxidativo na assistência ventilatória a neonatos das diversas espécies animais assistidas em Medicina Veterinária.

Por fim, o quadro de bronquite e bronquiolite associado à pleuro-pneumonia supurativa difusa marcada bacteriana observado no presente experimento no grupo SURF3 poderia ser conseqüente à exposição bacteriana fetal ainda em vida uterina, à incursão bacteriana do canal vaginal ou, ainda, ao contágio pós natal durante o procedimento ventilatório. Apesar de não ter sido realizada análise histopatológica placentária, a contaminação em vida fetal é uma opção remota, pois o acompanhamento gestacional da fêmea não evidenciou quaisquer alterações, as

.....

características dos líquidos alantoideano e amniótico estavam preservadas, assim como a avaliação macroscópica da placenta. Da mesma maneira, a contaminação no canal do parto apresenta pouca relevância, visto que esta se tratava de uma gestação gemelar e a avaliação histopatológica pulmonar do primeiro neonato, pertencente ao grupo SURF1, não evidenciou sinais de infecção bacteriana. Sendo assim, pondera-se a possibilidade da contaminação facilitada pela intubação traqueal e ventilação, ao longo de 2 horas.

Conclusão

.....

6 CONCLUSÃO

Com base no exposto, conclui-se que:

1) A terapia com surfactante exógeno porcino administrado pela via intra-traqueal, associado à ventilação manual com balão auto-inflável para cordeiros prematuros; acarretou menor vitalidade clínica e desempenho respiratório, em relação à animais ventilados não tratados;

2) A variável lactato sérico mostrou-se como marcador sensível do prognóstico neonatal, pois correlacionou-se com variáveis clínicas, hemogasométricas, antioxidantes e sobretudo, com a expectativa de vida pós-natal;

3) Foi determinado o perfil oxidativo no LA de fetos aos 135 dias de gestação, bem como, o grau de estresse oxidativo neonatal durante o primeiro dia de vida;

4) A ventilação manual com balão auto-inflável, associada ou não à terapia com surfactante intra-traqueal, induziu alterações estruturais e inflamatórias no parênquima pulmonar neonatal;

5) O protocolo terapêutico proposto a ovinos prematuros, com o desígnio de manter a adequada função respiratória e asseverar a sobrevivência neonatal mostrou-se pouco satisfatório em virtude da elevada mortalidade neonatal.

Referências

REFERÊNCIAS

ABITBOL, M. M.; MONHEIT, A. G.; STONE, M. L. Arterial PO₂, PCO₂, and pH versus transcutaneous PO₂ and PCO₂ and tissue pH in the fetal dog. **Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 155, n. 2, p. 437 - 443, 1986.

ADAMS, R.; GARRY, F. B.; ALDRIDGE, B. M.; HOLLAND, M. D.; ODDE, K. G. Physiologic differences between twin and single born beef calves in the first two days of life. **Cornell Veterinary**, v.83, p.13-29, 1993.

ADAS, J. T. M.; ALBUQUERQUE, E. D.; ZUCCHI, L. Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-nascido. In: CARVALHO, W. B.; HIRSCHHEIMER, M. R.; PROENÇA FILHO, J. O.; FREDDI, N. A.; TROSTER, E. J. **Ventilação Pulmonar Mecânica em Pediatria e Neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p.267-280.

ADELMAN, R. D.; WRIGHT, J. Systolic blood pressure and heart rate in the growing beagle puppy. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, p. 396-401, 1985.

ALEXANDER, G.; WILLIAMS, D. Shivering and non-shivering thermogenesis during summit metabolism in young lambs. **Journal of Physiology**, v. 198, p. 251–276, 1968.

ALMEIDA, M. F. B.; GUINSBURG, R. Programa de Reanimação Neonatal da Sociedade Brasileira de Pediatria: Condutas 2011. 2011. Disponível em <http://www.sbp.com.br/pdfs/PRN-SBP-Reanima%C3%A7%C3%A3oNeonatalFinal-2011-25mar11.pdf>. Acesso em 20 de abril de 2012.

ANDERSON, M. L.; MOORE, P. F.; HYDE, D. M.; DUNGWORTH, D. L. Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle: relationship to age. **Research in Veterinary Science**, v. 41, n. 2, p. 211-220. 1986.

ANDRADE, O. V. B.; HIRSCHHEIMER, M. R. Gasometria Arterial. In: CARVALHO, W. B.; HIRSCHHEIMER, M. R.; PROENÇA FILHO, J. O.; FREDDI, N. A.; TROSTER, E. J. **Ventilação Pulmonar Mecânica em Pediatria e Neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 369-376.

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; MELVILLE, G. J. Factors influencing dystocia and prediction of dystocia in Angus heifers selected for yearling growth rate. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 51, p. 147-153, 2000.

ASHRAF, M.; AHMED, N.; CHOWDHARY, J.; SAIF, R. U. Acute renal failure: nephrosonographic findings in asphyxiated neonates. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 22, n. 6, p. 1187-1192, 2011.

ATTAR, M. A.; DONN, S. M. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in premature infants. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 7, n. 5, p. 353-360, 2002.

AVERY, M. E.; MEAD, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. **American Journal of Diseases of Children**, v. 97, p. 517, 1959.

BANKS, W. J. Sistema Respiratório. In:_____. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992, p. 499–520.

BARMAN, N. N.; BHATTACHARYYA, R.; UPADHYAYA, T. N.; BAISHYA, G. Development of bronchus-associated lymphoid tissue in goats. **Lung**, v. 174, n. 2, p. 127–131. 1996.

BATCHELDER, C. A.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning and stem cells**, v.9, n.1, p.63-83, 2007.

BECA, J. P.; SCOPES, J. W. Serial determinations of blood lactate in Respiratory Distress Syndrome. **Archives of Disease in Childhood**, v. 47, p. 550-556, 1972.

BENESI, F. J. **Hematologia de bezerros recém-nascidos. Influência da asfixia neonatal, do tipo de parto e da ingestão de colostro sobre a crase sangüínea**. 1992. 126p. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

BEPPU, O. S. Surfactante Pulmonar. In: KOPELMAN, B. I.; GUINSBURG, R. **Distúrbios Respiratórios no Período Neonatal**. São Paulo. São Paulo: Atheneu, 1998, p. 33-42.

BERTINI, A. M.; TABORDA, W. C.; CAMANO, L. Avaliação pré-natal da Maturidade Pulmonar. In: RUGOLO, L. M. S. **Manual de Neonatologia**. São Paulo: Revinter, 2000.

BICK, U.; MULLER-LEISSE, C.; TROGER, J.; JORCH, G.; ROOS, N.; MEYER ZU WENDISCHHOFF, J.; FLOTHMANN, U.; KACHEL, W.; LEMBURG, P.; LINDERKAMP, O.; et al. Therapeutic use of surfactant in neonatal respiratory distress syndrome. Correlation between pulmonary x-ray changes and clinical data. **Pediatric Radiology**, v. 22, n. 3, p. 169-173, 1992.

BITTAR, R. Distúrbios Respiratórios. In: RUGOLO, L. M. S. **Manual de Neonatologia**. São Paulo: Revinter, 2000, p. 103-123.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**. 2.ed. Greene & Straton, p. 89-90. 1975.

BJORKLUNG, L. J.; INGIMARSSON, J.; CURSTEDT, T.; JOHN, J.; ROBERTSON, B.; WERNER, O.; VILSTRUP, C. T. Manual Ventilation with few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. **Pediatric Research**, v. 42, p. 348-355, 1997.

BLEUL, U.; LEJEUNE, S.; SCHWANTAG, S.; KAHN, W. Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. **Veterinary Record**, v. 161, p. 688-691. 2007.

BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOLT RJ, WEISSENBRUCH V, LAFEVER HN, WALL HAD. Glucocorticóides and Lung Development in the Fetus and Preterm Infant. **Pediatric Pulmonology**, v. 32, p. 76-91. 2001.

BOGAVAC, M.; LAKIC, N.; SIMIN, N.; NIKOLIC, A.; SUDJI, J.; BOZIN, B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complication in pregnancy. **Journal of Maternal-fetal and Neonatal Medicine**, v.10, epub ahead of print, 2011.

BOVINO, F.; CAMARGO, D. G.; DE MATOS, L. V. S.; PEIRÓ, J. R.; MENDES, L. C. N.; FEITOSA, F. L. F. 2010. Description of vital parameters and vitality of lambs born by normal delivery. **Anais XXVI World Buiatrics Congress**, p.

BRASCH, F.; JOHNEN, G.; WINN-BRASCH, A.; GUTTENTAG, S. H.; SCHMIEDL, A.; KAPP, N.; SUZUKI, Y.; MÜLLER, K. M.; RICHTER, J.; HAWGOOD, S.; OCHS, M. Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms in human lungs. **American Journal of Respiration Cellular Molecular Biology**, v. 30, p. 449-458, 2004.

.....

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; GIOIA, D. et al. Nucleated red blood cell at birth as a marker of perinatal brain damage. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, n. 6, p. 1500-1505, 1999.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; LONGINI, M.; et al. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. **Pediatric Research**, v. 52, p. 46 - 49, 2002.

BURRI, P. H. Fetal and postnatal development of the lung. **Annual Reviews Physiology**, v. 46, p. 617-629, 1984.

CARLSON, G. P. Clinical chemistry tests. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 3 ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 389-412.

CARSTENS, G. E. Cold thermoregulation in the newborn calf. In: HUNT, E. Perinatal mortality in beef herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n.1, p.69-106, 1994.

CHAN, W. W.; LONKER, F. H.; RAUSCH, W. D.; TAVERNE, M. A. M. Plasma catecholamines and blood chemistry in newborn calves in relation to different obstetrical procedures and to neonatal outcome. **Animal Reproduction Science**, v.34, n.1, p.43-54, 1993.

CHU, J.; CLEMENTS, J. A.; COTTON, E. K.; KLAUS, M. H.; SWEET, A. Y.; TOOLEY, W. H. Neonatal Pulmonary ischemia. Clinical and physiological studies. **Pediatrics**, v. 40, p. 709, 1967.

CLEMENTS, J. Surface tension of lung extrats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 95, p. 170-172, 1957.

COELHO, C. S. **Avaliação da função renal, do metabolismo ósseo e do equilíbrio hidroeletrolítico em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. Influência do fator etário**. 2002. 125p. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COMLINE, R. S.; SILVER, M. The composition of foetal and maternal blood during parturition in the ewe. **Journal of Physiology**, v. 222, p. 233-256, 1972.

.....

COTTON, R. B.; LINDSTRON, D. P.; KANAREK, K. S. et al. Effect of positive end-expiratory pressure on right ventricular output in lambs with hyaline membrane disease. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 69, p. 603-606, 1980.

CROSS, C. E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E. T.; PRYOR, W. A.; AMES, B. N.; SAUL, R. L.; MCCORD, J. M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. **Davis Conference of Annual Internal Medicine**, v. 107, p. 526-545. 1987.

DANI, C.; CORSINI, I.; BURCHIELLI, S.; CANGIAMILA, V.; ROMAGNOLI, R.; et al. Natural surfactant combined with beclomethasone decreases lung inflammation in the preterm lamb. **Respiration**, v. 82, p. 369-376, 2011.

DANI, C.; CORSINI, I.; BURCHIELLI, S.; CANGIAMILA, V.; LONGINI, M.; PATERNOSTRO, F.; BUONOCORE, G.; RUBALTELLI, F. F. Natural surfactant combined with beclomethasone decreases oxidative lung injury in the preterm lamb. **Pediatric Pulmonology**, v. 44, p. 1159-1167, 2009.

DAVIDSON, A. P. Approaches to reducing neonatal mortality in dogs. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. **Recent advances in small animal reproduction**. New York: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/concannon/Davidson/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em 05, maio, 2006.

DAY TK. Blood gas analysis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, p. 1031-1048, 2002.

DE MATTEO, R.; BLASCH, N.; STOKES, V.; DAVIS, P.; HARDING, R. Induced preterm birth in sheep: a suitable model for studying the developmental effects of moderately preterm birth. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 8, p. 724-733. 2010.

DIBARTOLA, S. P.; MORAIS, H. A. Disorders of potassium: hypokalemia and hyperkalemia. In: DIBARTOLA, S. P. **Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice**. 3. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 91-121.

DIESCH, T. J.; MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J.; WARD, R. N. The physiological and physical status of single calves at birth in dairy herd in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, n.5, p. 250-255. 2004.

DILDY, G. A. The future of intrapartum fetal pulse oximetry. **Obstetrics and Gynecology**, v. 13, p. 133-136. 2001.

-
- DIZDAR, E. A.; OGUZ, N. A. S.; ERDEVE, O.; SARI, F. M.; AYDEMIR, C.; DILMEN, U. Total antioxidant capacity and total oxidant status after surfactant treatment in preterm infants with respiratory distress syndrome. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, p. 462-467, 2011.
- DOCIMO, S. G., CRONE, R. K., DAVIES, P., REID, L. et al. Pulmonary development in fetal lamb. **The Anatomical Record**, v. 229, p. 495-498, 1991
- DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric Studies. IV. Hemochromogens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 112, p. 89-104, 1935.
- DWYER, C. M.; MORGAN, C. A. Maintenance of body temperature in the neonatal lamb: effects of breed, birth weight and litter size. **The Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1093-1101. 2006.
- EAST, C. E., COLDITZ, P. B. Intrapartum oximetry of the fetus. **Anesthesiology and Analgesy**, v. 105, n.6, p. S59-65. 2007.
- EIGENMANN, U. J. E.; SCHOON, H. A.; JAHN, D.; GRUNERT, E. Neonatal respiratory distress syndrome in the calf. **Veterinary Records**, v. 11, p. 141-144, 1984.
- FARIDAY, E. E. Effects of distension on release of surfactant in excised dog's lungs. **Respiratory Physiology**, v. 27, p. 99-114, 1976.
- FEITOSA, F. L. F. Exame físico geral ou de rotina. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A arte do Diagnóstico**, 2 ed, São Paulo: Roca, 2008, p. 65-86.
- FEITOSA, F. L. F.; PEIRÓ, J. R.; MENDES, L. C. N.; CADIOLI, F. A.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; BOVINO, F.; PERRI, S. H. V. p. 255-259, 2009. Determinação do perfil bioquímico renal sérico de bezerros holandeses e mestiços, na região de Araçatuba-SP. **Ciência Animal Brasileira**: Suplemento 1 – Trabalho apresentado no Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.
- FEITOSA, F. L. F.; PERRI, S. H. V.; BOVINO, F.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; GASPARELLI, E. R. F.; YANAKA, R.; CAMARGO, D. G. Avaliação da vitalidade de bezerros nelores nascidos de partos normais ou distócicos. **Ars Veterinaria**, v. 27(3), p. 01-07, 2011.

.....

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Formation or removal of oxygen radicals. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 92-104. 1984.

FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using Protein Chip Analysis. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 16, p. 271-177, 2004.

FRANK, L.; GROSECLOSE, E. E. Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. **Pediatric Research**, v. 18, p. 240–244, 1984.

FREEMAN, BA; CRAPO, JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Laboratory Investigation**, v. 47, n. 5, p. 412–26. 1982.

FUJIWARA, T.; MAETA, H.; CHIDA, S.; MORITA, T.; WATABE, Y.; ABE, T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. **The Lancet**, v. 1, p. 55, 1980.

GAZAL, O. S.; LI, Y.; SCHWABE, C.; ANDRESON, L. L. Attenuation of antepartum relaxin surge and induction of parturition by antiprogesterone RU 486 in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 233-240. 1993.

GITTO, E.; REITER, R. J.; KARBOWNIK, M.; TAN, D.; GITTO, P.; BARBERI, S.; BARBERI, I. Causes of oxidative stress in pre- and perinatal period. **Biology of the Neonate**, v. 81, p. 146-157, 2002.

GLUCK, L.; KULOUICH, M. V.; EIDELMAN, A.; CORDERO, L.; KHAZIN, A. F. Biochemical development of surface activity in mammalian lung. IV Pulmonary lecithin synthesis in the human fetus and newborn and etiology of the respiratory distress syndrome. **Pediatric Research**, v. 6, p. 81-99, 1972.

GOPINATHAN, V.; MILLER, N. J.; MILNER, A. D.; RICE-EVANS, C. A. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. **FEBS Letters**, v. 349, p. 197–200. 1994.

GORENBERG, D. M., PATTILLO, C., HENDI, P., RUMNEY, P. J., GARITE, T. J. Fetal pulse oximetry: Correlation between oxygen desaturation, duration and frequency and neonatal outcomes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, p. 136-138. 2003.

.....

GROPETTI, D.; PECILE, A.; DEL CARRO, A. P.; COPLEY, K.; MINERO, M.; CREMONESI, F. Evaluation of newborn canine viability by means of umbilical vein lactate measurement, apgar score and uterine tocodynamometry. **Theriogenology**, v. 74, n. 7, p. 1187–1196. 2010.

GROSSMANN, G.; NILSSON, R.; ROBERTSON, B. Scanning electron microscopy of epithelial lesions induced by artificial ventilation of the immature neonatal lung. **European Journal of Pediatric**, v. 145, p. 361–367, 1986.

GRUNDY, S. A. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 36, p. 443–459. 2006.

HALMERTSMA, F. J. J.; VANEKER, M.; SCHEFFER, G. J.; VAN DER HOEVEN, J. G. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 63, n. 10, p. 382–392, 2005.

HALL, S. B.; WANG, Z.; NOTTER, R. H. Separation of the subfractions of the hydrophobic components of calf lung surfactant. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p. 1386–1394, 1994.

HALLIDAY, H. L. Recent clinical trials of surfactant treatment for neonates. **Biology of the Neonate**, v. 89, p. 323–329, 2006.

HANLON-LUNDBERG, K. M.; KIRBY, R. S. Nucleated red blood cells as a marker of acidemia in term neonates. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 181, p. 196–201, 1999.

HARWOOD, J. L. Lung surfactant. **Progress in Lipid Research**, v. 26, p. 211–256, 1987.

HAUGHEY, K.G. The role of birth in the pathogenesis of meningeal haemorrhage and congestion in newborn lambs. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 49–56. 1980.

HAY, L. A. In: Aitken, I.D., Martin, W.B. (Eds.), Diseases of Sheep. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, p. 8–12. 1991.

HAWGOOD, S. Surfactant composition, structure and metabolism. In: **The lung: Scientific Foundations**, v. 2, p. 557–571, 1997.

HERMANSEN CL, LORAH KN. Respiratory Distress in the Newborn. **American Family Physician**, v. 76, n. 7, p. 987–95. 2007.

HERMANSEN, M. C. Nucleated red blood cells in the fetus and neonate. **Archives of diseases in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 84, p. F211-F215, 2001.

HERPIN, P.; DIVIDICH, J. L.; HULIN, J. C.; FILLAUT, M.; DE MARCO, F.; BERTIN, R. Effects of the level of asphyxia during delivery on viability at birth and early postnatal vitality of newborn pigs. **The Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2067-2075. 1996.

HILGENDORFF, A.; REISS, I.; RUPPERT, C.; HANFSTINGL, T.; SELINGER, A. S.; GUNTHER, A. et al. Positive end-expiratory pressures modifies response to recombinant and natural exogenous surfactant in ventilated immature newborn rabbits. **Biology of the Neonate**, v. 90, p. 210–216, 2006.

HOUPT, T. R. Equilíbrio ácido-básico. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, 1996, p. 549-559.

HUGHES, D. Interpretation of lactate- what is it? In: **North American Veterinary Conference (Eds)**. Disponível em: <http://www.ivis.org.br>. Acesso em 20 de abril de 2012.

IKEGAMI, M.; LEWIS, J. F.; TABOR, B.; RIDER, E. D.; JOBE, A. H. Surfactant protein A metabolism in preterm ventilated lambs. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. L765–L772, 1992.

INDER, T. E.; GRAHAN, P.; SANDERSON, K.; TAYLOR, B. J. Lipid peroxidation as a measure of oxygen free radical damage in the very low birthweight infant. **Archives of diseases in childhood**, v. 70, p. F107–F111, 1994.

JACKSON, J. C.; MACKENZIE, A. P. CHI, E. Y.; STANDAERT, T. A.; TROUG, W. E.; HODSON, W. A. Mechanisms for reduced total lung capacity at birth during hyaline membrane disease in premature newborn monkeys. **American Review of Respiratory Disease Journal**, v. 142, p. 413-419, 1990.

JAINUDENN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 2001, p. 335–347.

JOBE, A. Metabolism of endogenous surfactant and exogenous surfactants for replacement therapy. **Seminars in Perinatology**, v. 12, p. 231–244, 1988.

JOBE, A. H.; IKEGAMI, M. Protein permeability abnormalities in the preterm. In: **Lung Biology in Health & Disease**. Fluid and solute transport in the airspaces of the lung. EFFROS, R. M.; CHANG, H. K. Editora Mascel Dekker Inc., Nova Iorque, p. 355-355, 1994.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. In: **Histologia Básica**, 10^o edição (ed. Guanabara Koogan) 388 p, 2004

KANETO, F. M.; COELHO, C. S.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; BENESI, F. J. Glicemia e “anion-gap” em bezerras sadias da raça holandesa no primeiro mês de vida. **Ars Veterinaria**, v.20, n.3, p.291–298, 2004.

KARAPINAR, T.; DABAK, M. Treatment of Premature Calves with Clinically Diagnosed Respiratory Distress Syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p.462–466, 2008.

KOBAYASHI, T.; NITTA, K.; GANZUKA, M.; INUI, S.; GROSSMANN, G.; ROBERTSON, B. Neonatal respiratory failure. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. **Pediatric Research**, v. 29, v. 4, p. 353-356, 1991.

KOSCH PC, KOTERBA AM, COONS TJ, WEBB AI. Developments in management of the newborn foal in respiratory distress 1: Evaluation. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 312–318. 1984.

KRUSE, J. A.; CARLSON, R. W. Lactate metabolism. **Critical Care Clinics**, v. 5, p. 725-746, 1987.

LAMB CR, O'CALLAGHAN MW, PARADIS MR. Thoracic radiography in the neonatal foal: a preliminary report. **Veterinary Radiology**, v. 31, n.1, p. 11–16. 1990.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C.; SANTOS, T. C. M. Manejo do neonato. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.158-177.

LATSHAW WK. **Veterinary Developmental Anatomy**. Toronto: ed. B.C. Decker, 1987; pp. 119-125.

LEACH, C.L.; HOLM, B.; MORIN, F.C.; FUHRMAN, B.P.; PAPO, M.C.; STEINHORN, D.; HERNAN, L.J. Partial liquid ventilation in premature lambs with respiratory distress syndrome: Efficacy and compatibility with exogenous surfactant. **Journal of Pediatrics**, v. 126, n.3, p. 412–420. 1995.

LIEVRE, V.; BECUWE, P.; BIANCHI, A.; BOSSENMEYER-POURIE, C.; et al. Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. **Neuroscience**, v. 10, p. 287–297. 2001.

LIM, L. H.; WAGNER, E. M. Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 168, n. 9, p. 1068-1074, 2003.

LIMA, C. C. V.; SILVA, D. F. M.; COSTA, J. N.; COSTA NETO, A. O. Parâmetros fisiológicos de cordeiros mestiços (1/2 e 3/4 Dorper) do nascimento até os 90 dias de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11(2), p. 354–361, 2010.

LIPSETT, J.; COLL, J. C.; RUNCIMAN, S. I. C.; FORD, W. D. A.; KENNEDY, J. D.; MARTIN, A. J.; PARSONS, D. W. Morphometric analysis of preterm fetal pulmonary development in the sheep model of congenital diaphragmatic hernia. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 3, p. 17-28, 2000.

LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 10630 – 10637, 1998.

LÚCIO, C. F. **Influência das condições obstétricas ao nascimento sobre padrões de vitalidade e bioquímica neonatal na espécie canina**. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LUTTKUS, A. K.; CALLSEN, T. A.; STUPIN, J. H.; DUDENHAUSEN, J. W. Pulse oximetry during labour – does it give rise to hope? Value of status monitoring in comparison to fetal blood gas status. **European Journal of Obstetrics and Gynecology Reproductive Biology**, v. 110, p. 132-138. 2003.

MANKTELOW, BW e BASKERVILLE, A. Respiratory distress syndrome in newborn puppies. **Journal of Small Animal Practice**, v. 13, p. 329–332. 1972.

-
- MARGOTTO, P. R. Oximetria de pulso / Capnografia. Disponível em : http://www.paulomargotto.com.br/busca_resultado.php?busca=oximetria+de+pulso&Submit=Buscar. Acesso em 12 maio 2010.
- MARSHALL, T. A.; DEEDER, R.; PAI, S.; BERKOWITZ, G. P.; AUSTIN, T. L. Physiologic changes associated with endotracheal intubation in preterm infants. **Critical Care Medicine**, v. 12, p. 501-503. 1984.
- MASSIP, A. Relationship between pH, plasma, cortisol and glucose concentrations in the calf at birth. **British Veterinary Journal**, v.136, n.6, p.597-601, 1980.
- MATALON, S.; HOLM, B. A.; BAKER, R. R.; WHITFIELD, M. K.; FREEMAN, B. A. Characterization of antioxidant activities of pulmonary surfactant mixtures. **Biochimics and Biophysics Acta**, v. 1035, p. 121-127, 1990.
- MAZELA, J.; MERRITT, T. A.; FINNER, N. N. Aerosolized surfactants. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 19, p. 155-162. 2007.
- MENDELSON, Y.; KENT, J. C. Variations in optical absorption spectra of adult and fetal hemoglobin and its effect on pulse oximetry. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 36, p. 844-848, 1989.
- MILLER, D. R.; BLACHE, D.; JACKSON, R. D.; DOWNIE, E. F.; ROCHE, J. R. Metabolic maturity at birth and neonate lamb survival: association among maternal factors, litter size, lamb birth weight, and plasma metabolic and endocrine factors on survivor and behavior. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 581-593, 2009.
- MIYOSHI, M. H.; GUINSBURG, R. Desenvolvimento e Crescimento Pulmonar Perinatal. In: KOPELMAN, B. I.; GUINSBURG, R. **Distúrbios Respiratórios no Período Neonatal**. São Paulo: Atheneu, 1998, p. 03-14.
- MIYOSHI, M. H.; GUINSBURG, R.; KOPELMAN, B. I. Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-nascido. In: KOPELMAN, B. I.; GUINSBURG, R. **Distúrbios Respiratórios no Período Neonatal**. São Paulo: Atheneu, 1998, p. 63-74.
- MOON, P. F.; MASSAT, B. J.; PASCOE, P. J. Neonatal critical care. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 2, p. 343-366. 2001.

MOON-MASSAT, P. F.; ERB, H. N. Perioperative factors associated with puppy vigor after delivery by cesarean section. **Journal of American Hospital Association**, v. 38, p. 90-96. 2002.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**, 7ª edição (Elsevier Editora LTDA), 609 p, 2004

MUSCEDERE, J. G.; MULLEN, J. B.; GAN, K.; et al. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 149, p. 1327-1334, 1994.

NASSI, N.; PONZIANI, V.; BECATTI, M.; GALVAN, P.; GIANPAOLO, D. Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborn. **Pediatrics International**, v. 51, p. 183-187, 2009.

NASH, M.L., HUNGERFORD, L.L., NASH, T.G., ZINN, G.M. Risk factors for perinatal and postnatal mortality in lambs. **Veterinary Records**, v. 139, p. 64–67. 1996.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B.; BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**. v.67, n.2, p. 334-40, 2007

NIJLAND, M. J. M., SHANKAR, U., IYER, V., ROSS, M. G. Assessment of fetal scalp oxygen saturation determination in the sheep by transmission pulse oximetry. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, p. 1549-1553. 2000.

NIJLAND, R., JONGSMA, H. W., NIJHUIS, J. G., VAN DEN BERG, P. P., OESEBURG, B. Arterial oxygen saturation in relation to metabolic acidosis in fetal lambs. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, n. 3, p. 810-819. 1995.

NIJLAND, R. JONGSMA, H. W.; CREVELS, J.; MENSSEN, J. J. M.; NIJHUIS, J. G.; OESEBURG, B. Transmission pulse oximetry in fetal lamb: is there a universal calibration? **Pediatric Research**, v. 39, n. 3, p. 464–469. 1996.

NOGEE, L. M.; GARNIER, G.; DIETZ, H. C.; SINGER, L.; MURPHY, A. M.; DE MELLO, D. E.; COTEN, H. R. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal respiratory disease in multiple kindreds. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 1860–1893, 1994.

.....

NOWAK, R.; POINDRON, P. From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p. 431–446, 2006.

O'DONNELL, C. P.; DAVIS, P. G.; MORLEY, C. J. Use of supplementary equipment for resuscitation of newborn infants at tertiary perinatal centers in Australia and New Zeland. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 9, p. 1261-1265, 2005.

O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. **Cells Tissues Organs**, v. 192, p. 73–84, 2010.

PALLARDÓ, F. S.; SASTRE, J.; ASENSI, M.; RODRIGO, F.; ESTERELA, J. M.; VIÑA, J. Physiological changes in glutathione metabolism if fetal and newborn rat liver. **Biochemical Journal**, v. 274, p. 891–893, 1991.

PATTLE, R. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. **Nature**, v. 175, p. 1125-1126, 1955.

PERLMAN, J. M.; RISSER, R. Cardiopulmonary resuscitation in the delivery room. Associated clinical events. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 149, n. 1, p. 20-25, 1995.

PRINGLE, K. C. Human fetal lung developmental and related animal models. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 3, p. 502-513, 1986.

QUANUNGO, S.; MUKHERJEA, M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 215, p. 11–19, 2000.

RADES E, BITTAR RE, ZUGAIB M. Determinantes Diretos do Parto Prematuro Eletivo e os Resultados Neonatais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 26 (8): 655-662, 2004.

RANDALL, T. D. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT): structure and function. **Advances in Immunology**, v. 107, p. 187-241, 2010.

REBELLO, C. M. Uso do surfactante no recém-nascido. I Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica em Pediatria e Neonatologia, 2008. Disponível em: http://www.sbp.com.br/pdfs/I_Consenso_Brasileiro_de_Surfactante.pdf. Acesso em 25 maio 2011.

REBELLO C. M.; DINIZ, E. M. A. Surfactante pulmonar: Composição, função e metabolismo. **Pediatria moderna**, v. 36, p. 12-16, 2000.

RESENDE, J. G.; ZACONNETA, C. A. M.; PEREIRA, A. C. P.; SILVA, C. A. M.; RODRIGUES, M. P.; REBELLO, C. M.; TAVARES, P. Avaliação do pico de pressão, do volume corrente e frequência respiratória durante a ventilação de carneiros prematuros utilizando balão auto-inflável. **Jornal de Pediatria do Rio de Janeiro**, v. 82, p. 279-283, 2006.

REUSS, J. L. Factors influencing fetal pulse oximetry performance. **Journal of Clinical Monitoring**, v. 18, p. 13–24, 2004.

RIDER, E. D.; IKEGAMI, M.; WHITSETT, J. A.; HULL, W.; ABSOLOM, D.; JOBE, A. H. Treatment responses to surfactant containing natural surfactant proteins in preterm rabbits. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, p. 669–676, 1993.

RIMENSBERGER, P. C. Neonatal respiratory failure. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 14, n. 3, p. 315-321, 2002.

RODRIGUES, F. P. M. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. **Jornal da pediatria**, v. 74, n.2, p. 91-98, 1998.

RODRIGUES, J. A. **Assistência clínica maternal e neonatal às diferentes condições obstétricas em bovinos da raça Holandesa**. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RODRIGUES, J. A.; VEIGA, G. A. L.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; VANNUCHI, C. I. 2007. Avaliação por escore APGAR, temperatura e hemogasometria arterial em neonatos da espécie ovina. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba. Anais...2007, p.23.

RONCO, R. Blood lactate as prognostic marker in critically ill children. **Journal of Pediatric**, v. 81, p. 271-272, 2005.

RUSSEL, K. E.; HANSEN, B. D.; STEVENS, J. B. Strong ion difference approach to acid-base imbalances with clinical applications to dogs and cats. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v. 26, n. 5, p. 1185-1201, 1996.

-
- RUTH, V. J.; RAIVIO, K. O. Perinatal brain damage: predictive value of metabolic acidosis and the apgar score. **BMJ: British Medical Journal**, v. 32, n.1, p. 25-29, 1988.
- SALING, E. Comments of past and present situation of intensive monitoring of the fetus during labour. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 24, p. 7-13, 1996.
- SATO, A.; WHITSETT, J. A.; SCHEULE, R. K.; IKEGAMI, M. Surfactant protein D inhibits lung inflammation caused by ventilation in premature newborn lambs. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 181, p. 1098-1105, 2010.
- SAUNDERS, R. A.; MILNER, A. D.; HOPKIN, I. E. The effects of continuous positive airway pressure on lung mechanics and lung volumes in the neonate. **Biology of the Neonate**, v. 29, p. 178-186, 1976.
- SCHMÖLZER, G. M.; PAZ, A. B.; DAVIS, P. G.; MORLEY, C. J. Reducing lung injury during resuscitation of preterm infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 153, p. 741-745, 2008.
- SCHOCK, B. C.; SWEET, D. G.; ENNIS, M.; WARNER, J. A.; YOUNG, I. S.; HALLIDAY, H. L. Oxidative stress and increased type IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies. **Pediatric Research**, v. 50, p. 29-33, 2001.
- SCOTT, P. R. The management and welfare of some common ovine obstetrical problems in United Kingdom. **Veterinary Journal**, v. 170, p. 33-40. 2005.
- SEELBACH-GOBEL, B., HEUPEL, M., KUHNET, M., BUTTERWEGGE, M. The prediction of fetal acidosis by means of intrapartum fetal oximetry. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 180, p. 73-81, 1999.
- SHAH, S.; TRACY, M.; SMYTH, J. Post natal lactate as an early predictor of short-term outcome after intrapartum asphyxia. **Journal of Perinatology**, v. 24, p. 16-20, 2004.
- SHIMADA, S.; RAJU, T. N.; VIDYASAGAR, D.; MAETA, H.; BHAT, R. Chest radiographic course after exogenous surfactant therapy in baboons with respiratory distress syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 18, n. 9, p. 969-973, 1990.

-
- SILVA, L. C. G. **Parâmetros clínicos, hemogasométricos e radiográficos para avaliação respiratória de neonatos caninos nascidos em eutocia ou cesariana eletiva**. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; RODRIGUES, J. A.; VANNUCCHI, C. I. Avaliação clínica neonatal por escore Apgar e temperatura corpórea em diferentes condições obstétricas na espécie canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 103, p. 165–170. 2008.
- SIPRIANI, T. M.; GRANDI, F.; SILVA, L. C. G.; MAIORKA, P. C.; VANNUCCHI, C. I. Pulmonary maturation in canine foetuses from early pregnancy to parturition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44(2), p. 137-140, 2009.
- SIRISTATIDIS, C.; SALAMALEKIS, E.; KASSANOS, D.; LOGHIS, C.; CREATSAS, G. Evaluation of fetal intrapartum hypoxia by middle cerebral and umbilical artery doppler velocimetry with simultaneous cardiotocography and pulse oximetry. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 270, n. 4, p. 265-270. 2003.
- SOLL, R. F.; BLANCO, F. Natural surfactant extrat versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome. **Cochrane Database System Review**, v. 2, CD 001456, 2000.
- SOLL, R. F.; MORLEY, C. J. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. **Cochrane Database System Review**, v. 2, CD 000510, 2001.
- SOUSA, A. R.; AMORIM, M. R. Avaliação da vitalidade fetal intraparto. **Acta Medica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 229-240. 2008.
- SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. Valor prognóstico da acidose láctica durante a perfusão. **Revista Latinoamericana de tecnologia extracorpórea**, v. 111, p. 14-17, 2006.
- SOZO, F.; WALLACE, M. J.; HANNA, M. R.; FLECKNOE, S. J.; COCK, M. L.; MARITZ, G. S.; HARDING, R.; HOOPER, S. B. Alveolar epithelial cell differentiation and surfactant protein expression after mild preterm birth in sheep. **Pediatric Research**, v. 59(1), p. 151-156, 2006.

SPRENG, D. Intensive care of neonates and pediatrics. **Proceedings from a pre-congress symposium at the 29th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association** p. 40-44, 2004.

STEVENS, T. P.; SINKIN, R. A. Surfactant replacement therapy. **Chest**, v. 131, p. 1577–1582, 2007.

STRAND, M.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H. Effects of high PCO₂ on ventilated preterm lamb lungs. **Pediatric Research**, v. 53, n. 3, p. 468–472. 2003.

SYKES, A. R. The shelter requirements of the newborn lamb. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 42, p. 07–11. 1982.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 902p.

TANAKA, I.; IMPERIAL, M. C. G. Histórico da Ventilação Pulmonar Mecânica. In: CARVALHO, W. B.; HIRSCHHEIMER, M. R.; PROENÇA FILHO, J. O.; FREDDI, N. A.; TROSTER, E. J. **Ventilação Pulmonar Mecânica em Pediatria e Neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2005, p.03-11.

THILAGANATHAN, B., ATHANASIOU, S., OZMEN, S., CREIGHTON, S., WATSON, N. R., NICOLAIDES, K. H. Umbilical cord blood erythroblast count as an index of intrauterine hypoxia. **Archives of Disease in Children and Fetal Neonatology**, v. 70, n. 3, p. F192-194. 1994.

TREVISANUTO, D.; GRAZZINA, N.; FERRARESE, P., et al. Laryngeal mask airway used as a delivery conduit for the administration of surfactant to preterm infants with respiratory distress syndrome. **Biology of the Neonate**, v. 87, p. 217–220, 2005.

VAALA, W. E.; HOUSE, J. K. Perinatal adaptation, asphyxia and resuscitation. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 3 ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 266-376.

VAALA, W. E.; HOUSE, J. K.; MADIGAN, J. E. Parte três. Distúrbios e tratamento do neonato. In: SMITH, B. P. **Medicina interna de grandes animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2006. p. 255-386.

VAN KAAM, A. Lung protective ventilation in neonatology. **Neonatology**, v. 99, p. 338-341, 2011.

-
- VANNUCCHI, C. I.; RODRIGUES, J. A.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L. A clinical and hemogasometric survey of neonatal lambs. **Small Ruminant Research**. 24 p. No prelo,
- VENTO M, ASENSI M, SASTRE LLORET A, GARCIA-SALA E, VINA J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. **Journal of Pediatrics**, v. 142, n. 3, p. 240-246. 2003.
- VELDHUIZEN, R.; KAUSHIK, N.; ORGEIG, S.; POSSMAYER, F. The roles of lipids in pulmonary surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1408, p. 90-108, 1998.
- VERBRUGGE, S. J.; LACHMANN, B. Mechanism of ventilation-induced lung injury: Physiological rationale to prevent it. **Monaldi Archives for Chest Diseases**, v. 54, p. 22-37, 1999.
- VERHAEGHE, J.; BREE, R. V.; ERCK, V. B. Oxidant balance markers at birth in relation to glycemic and acid-base parameters. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 60, p. 71-77, 2011.
- VESTWEBER, J. G. Respiratory problems of newborn calves. **Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 411-424, 1997.
- VIVAN, M. C. R. **Correlação dos níveis de lactato sanguíneo com o estado neurológico e cardiorrespiratório de filhotes de cães nascidos de parto normal ou cesariana sob anestesia geral inalatória**. 2010. 157 p. Dissertação (mestrado). 2010.
- VLESSIS, A. A.; MELA-RIKER, L. Perinatal development of heart, kidney and liver mitochondrial antioxidant defense. **Pediatric Research**, v. 26, n. 3, p. 220-226. 1989.
- VON NEERGAARD, K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in der Alveolen, **Z. Gesamte Exp. Medicin.**, v. 66, p. 373-394, 1929.
- WILSMORE, A.J. Birth injury and perinatal losses in lambs. **In Practice** v. 11, p. 239-244. 1989.

.....

WRIGHT, J. R. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.10, p. 1453–1455. 2003.

YEOMANS, E. R.; HAUTH, J. C.; GILSTRAP, L. C.; STRICKLAND, D. M. Umbilical cord pH, PCO₂ and bicarbonate following uncomplicated term vaginal deliveries. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 151, p. 798–800. 1985.

ZIJLSTRA, W. G.; BUURSMA, A.; MEEUWSEN-VAN W. P. Absorption spectra of human, fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin and methemoglobin. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 1633–1631, 1991.

ZOEREN-GROBBEN, D.; LINDEMAN, J. H. N.; HOUDKAMP, E.; MOISON, R. M. W.; WIJNEN, J. T.; BERGER, H. M. Markers of oxidative stress and antioxidant activity in plasma and erythrocytes in neonatal respiratory distress syndrome. **Acta Paediatrica**, v. 86, p. 1356-1362, 1997.

Anexo A

FORMULAÇÃO DO REAGENTE DE COR – ESTOQUE (15 a 25 °C)

- ferricianeto de potássio 60,7 mmol/L
- cianeto de potássio 76,8 mmol/L
- surfactante

PREPARO DO REAGENTE DE COR DE USO

Adicionar 10 mL do Reagente de cor de estoque a 990 mL de água destilada ou deionizada e homogeneizar. Estável durante 6 meses, em frasco ambar, entre 15 e 25 °C.

Anexo B**FORMULAÇÃO DO FIXADOR METANOL (1L) – ESTOQUE (15 a 25 °C)**

Metanol (P.A.)..... 600 mL

Clorofórmio..... 300 mL

Ácido acético (P.A.)..... 100 mL