LETICIA LIMA DE ALMEIDA

# Efeito da suplementação materna antenatal de Glutationa Reduzida (GSH) no metabolismo redox e adaptação neonatal imediata de cães nascidos por cesariana

São Paulo

2022

LETICIA LIMA DE ALMEIDA

# Efeito da suplementação materna antenatal de Glutationa Reduzida (GSH) no metabolismo redox e adaptação neonatal imediata de cães nascidos por cesariana

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

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de Concentração:**

Reprodução Animal

**Orientadora:**

Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi

São Paulo

2022

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

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO**

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

4274
FMVZ

Almeida, Leticia Lima de
Efeito da suplementação materna antenatal de Glutationa Reduzida (GSH) no metabolismo redox e adaptação neonatal imediata de cães nascidos por cesariana / Leticia Lima de Almeida. – 2022.
85 f. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi.

1. Antioxidante. 2. Redox. 3. Neonatologia. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

# CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O efeito da administração materna pré-natal de Glutationa Reduzida na adaptação pulmonar de neonatos caninos submetidos ou não à oxigenoterapia", protocolada sob o CEUA nº 8457030918 (ID 005884), sob a responsabilidade de **Camila Infantosi Vannucchi** *e equipe; Leticia Lima de Almeida* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/12/2018.

We certify that the proposal "The effect of prenatal maternal administration of Reduced Glutathione on the pulmonary adaptation on canine neonates submitted or not to oxygen therapy", utilizing 110 Dogs (males and females), protocol number CEUA 8457030918 (ID 005884), under the responsibility of **Camila Infantosi Vannucchi** *and team; Leticia Lima de Almeida* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/12/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 09/2022 Área: Reprodução Animal

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Origem: | Animais de proprietários | | | | | | |
| Espécie: | Cães | sexo: | Fêmeas | idade: | 2 a 6 anos | N: | 30 |
| Linhagem: | Raças variadas | | | Peso: | 15 a 100 kg | | |
| Origem: | Animais de proprietários | | | | | | |
| Espécie: | Cães | sexo: | Machos e Fêmeas | idade: | 0 a 1 dias | N: | 80 |
| Linhagem: | Raças variadas | | | Peso: | 230 a 1000 g | | |

Local do experimento: Laboratório de Inseminação Artificial Perinatologia e Patologia da Reprodução (Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo).

São Paulo, 25 de março de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camila Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no Uso de Animais*

São Paulo, 03 de setembro de 2018
CEUA N 8457030918

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ALTERAÇÃO DE DADOS (ID 82254) À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

| | |
|---|---|
| CPF: | 182.587.888-89 |
| Título da proposta: | O efeito da administração materna pré-natal do Glutationa Reduzida na adaptação pulmonar de neonatos caninos submetidos ou não à oxigenoterapia |
| Responsável: | Camila Infantosi Vannucchi |
| Equipe: | Letícia Lima de Almeida |
| Telefone: | (11) 992412323 e-mail: cocovann@usp.br |

**Resumo:** *Solicito apenas mudança de título do trabalho para melhor expressar seu conteúdo*

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema ("https://orion.fmvz.usp.br/") por meio de seu senha de acesso.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camila Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALMEIDA, Leticia Lima

Título: **Efeito da suplementação materna antenatal de Glutationa Reduzida (GSH) no metabolismo redox e adaptação neonatal imediata de cães nascidos por cesariana**

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 Doutora em Ciências.

**DATA___/___/___**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

*À minha família... sem vocês eu nada seria.*

## AGRADECIMENTOS

Em um país onde a porcentagem de Doutores na população é menos de 1%, ser a primeira pessoa da minha família a ter a oportunidade de defender uma tese de doutorado em uma das melhores universidades do mundo é extremamente gratificante.

E por falar em família, nada mais justo do que começar os meus agradecimentos pela minha mãe: minha base, minha motivação por um futuro melhor. Obrigada mãe, por estar sempre ao meu lado acreditando e apoiando todos os meus objetivos. Gostaria que toda vez que você se questionar se em algum momento você errou como mãe, pare e olhe para frente: veja onde as suas crias chegaram. Obrigada por cada dia que você precisou se ausentar para poder arcar com os nossos estudos e a nossa criação. Minhas conquistas são todas suas também. Se orgulhe de tudo o que você fez e faz por nós.

Falar sobre família sempre teve um significado muito grande para mim, pois sou muito grata e feliz em ter escolhido nascer na minha família. Cada um tem um papel muito importante na minha vida. Cada raiz, cada galhinho e cada folha e fruto da nossa árvore que me fazem ser o que sou hoje: obrigada à minha família pela vida.

Se engana quem acredita que a definição de família se limita a laços sanguíneos, pois encontramos família onde conseguimos fazer morada, onde nos sentimos acolhidos e encontramos carinho, exatamente como me senti ao longo desses quase 7 anos fazendo parte do VRA e do LIAPP. Professora Camila, sou muito grata pela oportunidade, ensinamentos e confiança depositada em mim. Aos meus amigos de laboratório, de departamento e de momentos de vida: essa tese também é de vocês, pois sozinha não se chega a lugar nenhum. Obrigada por me acompanharem sempre.

Às minhas amigas de faculdade, de profissão e de vida: obrigada por estarem presentes sendo ouvidos, ombros, abraços e colo em cada situação que me fez escorregar. Em vocês encontro parte de mim também.

Ao meu noivo, Arthur, você apareceu na minha vida quando eu mais precisava de você, sem eu nem saber que eu precisava tanto assim. Gostaria de conseguir me enxergar um pouco mais com seus olhos, toda vez que você me

motiva dizendo que eu sou a melhor no que faço. Saiba que não, eu não sou a melhor, mas ter você acreditando diariamente nisso, me faz querer melhorar e me esforçar cada vez mais. Obrigada por me escolher como sua companheira de vida.

A todos os docentes e funcionários do VRA: obrigada pela sabedoria e ensinamentos passados. Saibam que hoje eu sou outra pessoa e profissional graças a vocês também. Em especial, obrigada a todos do Biosptz, do LA e do LDH pelas portas sempre abertas.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade de São Paulo: obrigada pela infraestrutura e qualidade de serviço e ensino oferecidos durante a minha jornada acadêmica e profissional.

À CAPES, pelo apoio financeiro – Código de Financiamento 001. À FAPESP, também pelo apoio financeiro.

Por último, mas com certeza não menos importante, a todos os animais que fizeram parte deste estudo; e a todos os animais que fizeram parte da minha vida. Afinal, trilho meu caminho profissional por todos vocês.

*"Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida" – Sócrates*

## EPÍGRAFE

*I can almost see it*
*That dream I'm dreaming*
*But there's a voice inside my head*
*Saying: You'll never reach it*

*Every step I'm taking*
*Every move I make feels*
*Lost, with no direction*
*My faith is shaking*

*But I, I gotta keep trying*
*Gotta keep my head held high*
*There's always gonna be another mountain*
*I'm always gonna wanna make it move*
*Always gonna be an uphill battle*
*Sometimes, I'm gonna have to lose*
*Ain't about how fast I get there*
*Ain't about what's waiting on the other side*
*It's the climb*

*The struggles I'm facing*
*The chances I'm taking*
*Sometimes might knock me down, but*
*No, I'm not breaking*

*I may not know it*
*But these are the moments that*
*I'm gonna remember most*
*Just gotta keep going*

*And I, I gotta be strong*
*Just keep pushing on because*
*There's always gonna be another mountain*
*I'm always gonna wanna make it move*
*Always gonna be an uphill battle*
*Sometimes, I'm gonna have to lose*
*Ain't about how fast I get there*
*Ain't about what's waiting on the other side*

*It's the climb*
*Keep on moving*
*Keep climbing*
*Keep the faith*

*(Miley Cyrus – The Climb)*

# RESUMO

ALMEIDA, L.L. **Efeito da suplementação materna antenatal de Glutationa Reduzida (GSH) no metabolismo redox e adaptação neonatal imediata de cães nascidos por cesariana.** 2022. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Ao nascimento, os neonatos são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo, por aumento exponencial da produção de radicais livres durante a brusca transição do ambiente intrauterino hipoxêmico para o ambiente extra-uterino hiperóxico, somado à imaturidade do sistema antioxidante neonatal. Portanto, a suplementação antenatal de antioxidantes, tal como a glutationa reduzida (GSH), pode auxiliar na redução dos efeitos deletérios do estresse oxidativo na transição feto-neonatal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação antenatal de GSH no metabolismo redox das fêmeas e seus respectivos neonatos, bem como na vitalidade neonatal de cães nascidos por cesariana eletiva. Para tal, os neonatos foram alocados em 4 grupos experimentais, de acordo com a dose administrada de GSH (por peso materno, IV antes da indução anestésica): Grupo Controle (não tratado, n=7); Grupo 5 mg/kg (n=5); Grupo 10 mg/kg (n=5) e Grupo 20 mg/kg (n=5). As cadelas foram avaliadas no período pródromos do parto, intraparto e 1h pós-parto, quando amostras de sangue foram colhidas para análise do metabolismo redox [atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx); determinação do *status* antioxidante total (TAC); dosagem indireta do óxido nítrico (ON), da concentração indireta de tióis totais (GSH), da peroxidação lipídica (TBARS), da oxidação de proteínas e de tióis totais]. Os neonatos foram avaliados quanto às frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), tônus muscular, irritabilidade reflexa, coloração de mucosa, saturação periférica de oxigênio ($SpO_2$) ao nascimento, 1h, 6h, 12h e 24 horas pós-nascimento. Amostras de sangue foram coletadas, nos mesmos momentos, para determinação da lactatemia e metabolismo redox. As fêmeas apresentaram maior grau de peroxidação lipídica no Grupo Controle em relação aos Grupos 5 e 10; assim como houve maior peroxidação lipídica nos pródromos em relação aos demais tempos. A concentração indireta de ON foi menor no Grupo Controle em relação ao Grupo 5. Os neonatos do Grupo Controle apresentaram maior concentração de GSH em comparação ao Grupo 5; maior grau de peroxidação lipídica em comparação aos Grupos 5 e 20; maior concentração indireta de ON em comparação ao Grupo 20; maior atividade da SOD em comparação ao Grupo 10; e maior lactatemia em relação a todos os grupos. Ademais, não houve diferença estatística de vitalidade neonatal em nenhum dos grupos avaliados. Em conclusão, a suplementação antenatal com GSH não impôs efeito na

vitalidade neonatal, bem como na concentração neonatal de GSH, entretanto, diminuiu o grau de peroxidação lipídica e lactatemia dos neonatos.

**Palavras-chave:** neonatologia, redox, tióis, antioxidante

## ABSTRACT

ALMEIDA, L.L. **Effect of maternal antenatal Reduced Glutathione (GSH) supplementation on redox metabolism and immediate neonatal adaptation on dogs delivered by caesarean section. [Efeito da suplementação materna antenatal de Glutationa Reduzida (GSH) no metabolismo redox e adaptação neonatal imediata de cães nascidos por cesariana.]** 2022. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

At birth, neonates are highly susceptible to oxidative stress, due to the exponential increase in the production of free radicals during the sudden transition from the hypoxemic intrauterine environment to the hyperoxic extrauterine environment, in addition to immature neonatal antioxidant system. Therefore, antenatal supplementation of antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), may help reduce the deleterious effects of oxidative stress in the fetal-neonatal transition. The aim of this study was to evaluate the effect of antenatal GSH supplementation on the redox metabolism of females and their respective neonates, as well as on the neonatal vitality of dogs born by elective cesarean section. Thus, neonates were allocated into 4 experimental groups, according to the administered dose of GSH (by maternal weight, IV before anesthetic induction): Control Group (untreated, n=7); 5 mg/kg group (n=5); Group 10 mg/kg (n=5) and Group 20 mg/kg (n=5). Bitches were evaluated during the preparatory phase of whelping, intrapartum and 1h postpartum, when blood samples were collected for analysis of redox metabolism [Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPx) activity enzymes assays; Total Antioxidant Capacity (TAC); thiols (GSH), oxide nitric (ON), lipid peroxidation (TBARS) and protein oxidation assays]. Neonates were evaluated for the neonatal viability score at 0 and 60 minutes of birth; clinical evaluation (heart and respiratory rates; muscle tone, irritability reflex and mucous color score; and body temperature), blood lactate, pulse oximetry, analysis of redox metabolism, and body weight measurement at 0, 60 minutes, 6, 12 and 24 hours after birth. Bitches hah higher lipid peroxidation in the Control Group compared to Groups 5 and 10; lipid peroxidation was higher in the prodromes in relation to the other evaluation moments. NO concentration was lower in the Control Group compared to Group 5. Neonates in the Control Group had higher concentration of GSH compared to Group 5; higher lipid peroxidation compared to Groups 5 and 20; higher NO concentration compared to Group 20; higher SOD activity compared to Group 10; and higher lactatemia in relation to all groups. Furthermore, there was no statistical difference in neonatal vitality in any of the assessed groups. In conclusion, antenatal supplementation with GSH had no effect on neonatal vitality, as well as on GSH neonatal concentration, however, it decreased lipid peroxidation and lactatemia in neonates.


**Key-words:** neonatology, redox, thiols, antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 2** - Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adaptado de KENSLER et al. (2007). São Paulo, 2022. ..... .26

**Figura 3** – Delineamento experimental das avaliações maternas, independente do grupo experimental. São Paulo, 2022. ..... 42

**Figura 4** - Delineamento experimental das avaliações neonatais, independente do grupo experimental. São Paulo, 2022. ..... 42

**Figura 5** - Esquematização da reação de Griess (SUN et al., 2003). ..... 45

**Figura 6** - Média e erro padrão para peroxidação lipídica (TBARS; ng/mL) materna entre os Grupos (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg) e entre os tempos experimentais (pródromos, intraparto e 1h pós-parto). São Paulo, 2022. ..... 55

**Figura 7** - Média e erro padrão da concentração indireta de óxido nítrico (µM) no soro materno entre os grupos (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022. ..... 55

**Figura 8** - Média e erro padrão para o escore de vitalidade neonatal (0-10) ao longo do tempo (0h e 1h). São Paulo, 2022. ..... 57

**Figura 9** - Média e erro padrão para a frequência respiratória (mpm) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022. ..... 58

**Figura 10 -** Média e erro padrão para o escore de tônus muscular (0-2) (A), irritabilidade reflexa (0-2) (B) e coloração de mucosa (0-2) (C) ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022. ..... 58

**Figura 11** - Média e erro padrão para a frequência cardíaca (bpm) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022. ..... 59

**Figura 12** - Média e erro padrão para temperatura corporal (°C) e saturação de oxigenação periférica (SpO2 %) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h) (A e C, respectivamente), e para a temperatura corporal entre os grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg) (B). São Paulo, 2022. ..... 59

**Figura 13** - Média e erro padrão para peroxidação lipídica (TBARS; ng/mL) (A) e da concentração indireta de óxido nítrico (NO; µM) (B) dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022. ..... 60

**Figura 14 -** Média e erro padrão da atividade da Superóxido Dismutase (SOD; U/mL) sérica dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022. ..... 60

**Figura 15** - Média e erro padrão para a concentração de tióis totais (GSH; µM) dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022. ..... 61

**Figura 16** - Média e erro padrão da atividade sérica da Glutationa Peroxidase (GPx; U/mL) dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg) (A) e ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h) (B). São Paulo, 2022. ..... 61

**Figura 17** - Média e erro padrão para oxidação de proteínas (mg de proteínas/mL) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022. ..... 62

**Figura 18** - Média e erro padrão para lactatemia sanguínea (mMol/L) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h) e nos Grupos (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022. ..... 62

**Figura 19** - Regressão linear dos valores de lactatemia (mMol/L) em função das diferentes doses de tratamento com GSH (0, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022. ..... 63

**Figura 20** – Análise de correlação das variáveis maternas e neonatais do Grupo Controle. São Paulo, 2022. ..... 64

**Figura 21** - Análise de correlação das variáveis maternas e neonatais dos grupos tratados. São Paulo, 2022. ..... 65

**Figura 22** - Análise de correlação das variáveis maternas e neonatais dos grupos tratados. São Paulo, 2022. ..... 65

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Efeito da administração exógena de SOD/CAT ou superexpressão de SOD em modelos animais de lesão pulmonar causada por hiperóxia (adaptado de Poggi e Dani, 2014). São Paulo, 2022. ..... 27

**Tabela 2** – Número de neonatos avaliados, idade, raça e distribuição nos grupos experimentais das fêmeas selecionadas (n=22). São Paulo, 2022. ..... 40

**Tabela 3** - Parâmetros adotados para avaliação do escore Apgar adaptado à espécie canina (adaptado de Silva *et al*., 2008), São Paulo, 2022. ..... 48

**Tabela 4** - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Controle vs. 5 mg/kg vs. 10 mg/kg vs. 20 mg/kg) e tempo (Pródromos, Intraparto e 1h pós-parto) e sua interação para as variáveis experimentais maternas (p<0,05). São Paulo, 2022. ..... 53

**Tabela 5 -** Valores e médias do tempo (min) decorrido entre a administração do tratamento e o início da cirurgia, o nascimento do primeiro e do segundo neonato avaliado, a metade e o final da cirurgia; e o número de filhotes nascidos em cada grupo experimental. São Paulo, 2022..... 54

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 20**
**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 23**
**2.1 Transição feto-neonatal e a influência da condição obstétrica ..... 23**
**2.2 O estresse oxidativo no período neonatal e terapias antioxidantes ..... 26**
**3 HIPÓTESE ..... 35**
**4 OBJETIVOS ..... 37**
**5 MATERIAL E MÉTODOS ..... 39**
5.1 Animais e grupos experimentais ..... 39
**5.1.2 Delineamento experimental ..... 41**
**5.1.3 Coleta e armazenamento das amostras de sangue ..... 43**
**5.1.4 Análise do metabolismo redox ..... 43**
**5.1.5 Escore de vitalidade e avaliação clínica neonatal ..... 48**
**5.1.6 Peso corporal ..... 49**
**5.1.7 Saturação periférica de oxigênio ..... 49**
**5.1.8 Lactatemia sanguínea ..... 50**
**5.1.9 Análise estatística ..... 50**
**6 RESULTADOS ..... 53**
**6.1 Análises maternas ..... 53**
**6.2 Análises neonatais ..... 56**
**6.3 Análises de correlação entre as variáveis maternas e neonatais ..... 63**
**7 DISCUSSÃO ..... 67**
**7.1 Análises maternas ..... 67**
**7.2 Análises neonatais ..... 70**
7.2.1 Análises clínicas ..... 70
7.2.2 Análise do metabolismo redox ..... 73
**7.3 Correlação do estresse oxidativo e do perfil antioxidante materno e neonatal ..... 75**
**8 CONCLUSÃO ..... 79**
**10 REFERÊNCIAS ..... 80**

# *Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, é notório o crescimento do interesse em possuir animais de estimação, os quais, muitas vezes, incluem-se no âmbito familiar afetivo. Desta forma, cresce também a criação de raças com habilidades específicas para cada finalidade. Simultaneamente ao aumento da criação de cães, as cesarianas, planejadas ou emergenciais, tornaram-se cada vez mais frequentes para a espécie. A cesariana planejada pode ser indicada para cadelas de raças nas quais há incompatibilidade de diâmetros materno-fetais (principalmente para raças braquicefálicas), cadelas com histórico anterior de distocia ou cesariana prévia, ninhada muito numerosa ou de feto único, além de cadelas nulíparas com idade igual ou superior a seis anos (Smith, 2007).

A despeito do avanço na Medicina Veterinária, as taxas de mortalidade neonatal em cães variam de acordo com a condição do parto; sendo 5,5% para eutocias, 33% para distocia e entre 6 e 11% para cesariana eletiva ou emergencial (Moon *et al.*, 2001). O período de transição feto-neonatal, que abrange as primeiras 24 horas de vida, é considerado o mais crítico para a sobrevivência neonatal. Neste período, a transição para a vida extrauterina requer rápida adaptação fisiológica do neonato para assumir funções anteriormente exercidas pela placenta, como por exemplo, a troca gasosa pulmonar (Vannucchi e Abreu, 2017).

Na espécie canina, a recuperação de neonatos nascidos por cesariana (planejada ou emergencial), especialmente sem prévio início do trabalho de parto, é tardia (Silva, *et al.* 2008; Batista *et al.* 2014), e pode ser atribuída à menor absorção pulmonar decorrente da ausência de estímulos hormonais e da passagem pelo canal do parto que ocorrem em um parto vaginal (Silva *et al.*, 2015; Abreu, 2018). Além disso, soma-se a depressão decorrente dos efeitos anestésicos, visto que todos os fármacos anestésicos possuem a capacidade de atravessar rapidamente a barreira placentária, causando depressão das funções vitais em graus variados (Akin *et al.*, 2019).

Em vida intrauterina, os fetos estão sujeitos ao ambiente hipoxêmico e os pulmões são repletos de líquido. Porém, após o nascimento e ao início da respiração

pulmonar, os pulmões passam a ser preenchidos por ar e alta concentração de oxigênio, resultando em aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que somado à imaturidade do sistema antioxidante neonatal, propiciam o estresse oxidativo (Buonocore *et al.*, 2002; Sgorbini *et al.*, 2015).

Almeida e colaboradores (2022) observaram que neonatos caninos nascidos por cesariana não emergencial apresentaram correlação positiva entre a atividade antioxidante sérica e variáveis relativas à vitalidade neonatal, tais como a frequência respiratória, irritabilidade reflexa, tônus muscular, saturação periférica de oxigênio, escore de coloração de mucosa e temperatura corporal, indicando a possibilidade de um efeito benéfico dos antioxidantes na transição respiratória neonatal nesta espécie.

Em Medicina, o tratamento de doenças respiratórias com diversos antioxidantes tem sido relatado (Lee e Davis, 2011; Berkelhamer e Farrow, 2014; Nagel *et al.*, 2019) e observou-se efeito benéfico principalmente da GSH e da GPx na função pulmonar (Schunemann *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2012; Khatri *et al.*, 2014). Entretanto, os efeitos da terapia antioxidante materna pré-natal na função pulmonar de neonatos ainda não foram relatados na literatura. Portanto, diante do exposto, justificam-se estudos acerca da suplementação antioxidante materna pré-natal, objetivando a melhora na adaptação respiratória neonatal de cães termos nascidos por cesariana eletiva.

# *Revisão de Literatura*

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Transição feto-neonatal e a influência da condição obstétrica

A circulação fetal apresenta diferenças fisiológicas e anatômicas da circulação extra-uterina, visando promover adequado suprimento das necessidades de um organismo em crescimento rápido em um ambiente intra-uterino hipóxico, quando comparado ao extra-uterino. A única conexão entre o feto em crescimento e o meio exterior é a placenta, a qual promove funções vitais essenciais para o desenvolvimento fetal tais como a oxigenação, nutrição e excreção de resíduos do sangue fetal (Mattos, 1997).

A circulação fetal é caracterizada por alta resistência ao fluxo sanguíneo dos pulmões fetais, que estão repletos por líquido, e baixa resistência placentária, o que garante que o sangue fetal pobre em oxigênio e de baixa pressão consiga retornar à placenta pela artéria umbilical. O sangue oxigenado materno chega ao feto através da placenta pela veia umbilical e, parte desse volume sanguíneo tem destino hepático e o restante segue para a veia cava inferior através do ducto venoso. O sangue então chega ao átrio direito, e pelo forame oval, parte é direcionado para o átrio esquerdo; e pela valva tricúspide, parte é direcionado para o ventrículo direito. O sangue do ventrículo direito é então ejetado para a artéria pulmonar. Apenas cerca de 10% deste sangue é destinado aos pulmões, enquanto o restante é redirecionado pelo ducto arterial para a aorta descendente, e, após perfundir o corpo, retorna para a placenta através da artéria umbilical. O sangue que chega no átrio esquerdo é direcionado para o ventrículo esquerdo, e ejetado para a aorta ascendente, artérias coronárias e o cérebro (Mattos, 1997; Kiserud, 2005; Finnemore e Groves, 2015; Morton e Brodsky, 2016).

A transição feto-neonatal envolve um processo de adaptação rápida e multi-sistêmica do organismo, a qual a mudança mais crítica está relacionada ao início da respiração. Ao nascimento, com o rompimento do cordão umbilical e perda da ligação entre o feto e a placenta, o recém-nascido passa a depender somente dos seus pulmões para efetiva troca gasosa (Veronesi, 2016). Na espécie canina, as 24 primeiras horas de vida são consideradas um período de transição feto-neonatal, o

qual requer rápida adaptação fisiológica, anatômica e metabólica do neonato para assumir funções vitais previamente exercidas pela placenta. Por esta razão, o período de transição é considerado o mais crítico para a sobrevivência (Lourenço e Machado, 2013).

As primeiras inflações pulmonares decorrentes do início da respiração neonatal causam uma diminuição rápida da resistência pulmonar, aumentando assim o fluxo sanguíneo neste órgão. Devido ao aumento acentuado do retorno sanguíneo oriundo das veias pulmonares ao átrio esquerdo, também ocorre rápida elevação da pressão, culminando no fechamento funcional do forame oval. O canal arterial se fecha gradualmente sob a influência da oxigenação e do metabolismo das prostaglandinas no pulmão (Davis e Mychaliska, 2013; Finnemore e Groves, 2015; Morton e Brodsky, 2016).

Ainda, a distensão alveolar resultante das primeiras inspirações estimula a produção enzimática de óxido nítrico. Por sua vez, o óxido nítrico promove vasodilação, apresentando um importante papel na gradativa adaptação dos sistemas cardiovascular e pulmonar do neonato (Mutinati *et al.*, 2014). Ao final desta transição, todo o sangue pobre em oxigênio que retorna para o lado direito do coração é direcionado aos pulmões para oxigenação, e, em contrapartida, todo o sangue oxigenado oriundo dos pulmões retorna ao lado esquerdo do coração, responsável agora pelo bombeamento deste sangue ao resto do corpo (Finnemore e Groves, 2015; Morton e Brodsky, 2016).

Durante a vida fetal, a distensão mecânica pelo acúmulo de fluído pulmonar desempenha papel importante para o desenvolvimento dos pulmões. Este fluído é secretado pelas células alveolares, em decorrência do transporte ativo de cloreto através do epitélio pulmonar e direciona-se para as vias aéreas superiores, sofrendo resistência pela laringe e nasofaringe e resultando na pressão responsável pela expansão pulmonar intra-uterina (Helve *et al.*, 2009; Katz *et al.*, 2011; Davis e Mychaliska, 2013). Embora o fluído pulmonar desempenhe importante papel no desenvolvimento do sistema respiratório, sua remoção ao nascimento é imprescindível para adequada troca gasosa pulmonar.

Para tanto, ao início da vida extra-uterina, o epitélio pulmonar precisa de forma rápida e eficiente passar a absorver sódio, e, consequentemente água, e cessar

a transporte ativo de cloreto, encerrando assim a secreção do fluído. Tal mudança no mecanismo de secreção e absorção é desencadeada pela ação de hormônios envolvidos no trabalho de parto, especialmente as catecolaminas e o cortisol (Katz *et al.*, 2011; Davis e Mychaliska, 2013; Morton e Brodsky, 2016). O fluído absorvido é então acumulado no tecido conjuntivo frouxo das áreas perivasculares e drenado pelo sistema linfático durante as 2 primeiras horas pós-nascimento (Helve *et al.*, 2009; Katz *et al.*, 2011; Morton e Brodsky, 2016), podendo levar até 24 horas (Helve *et al.*, 2009).

Além da ação hormonal durante o parto vaginal, as contrações uterinas e a compressão torácica fetal com a passagem no canal de parto também contribuem para melhor absorção do fluído pulmonar. Portanto, atualmente já é muito bem estabelecido, tanto na Medicina quanto na Medicina Veterinária, que neonatos nascidos por cesariana, especialmente sem o prévio início do trabalho de parto, apresentam absorção pulmonar e adaptação respiratória menos eficiente e mais tardia (Silva *et al*., 2015; Abreu 2018).

Além disso, o disparo inicial para a respiração neonatal é resultante da moderada privação de oxigênio e consequente aumento da pressão parcial de dióxido de carbono nos vasos umbilicais, decorrente das contrações uterinas e da ruptura do cordão umbilical, além dos estímulos táteis e térmicos através da passagem do feto pelo canal do parto (Silva *et al*., 2008; Lourenço e Machado, 2013). Por outro lado, o principal estímulo para o início da troca gasosa pulmonar em neonatos nascidos por cesariana é o clampeamento do cordão umbilical seguido das manobras de massagem torácica na reanimação neonatal. Ademais, por mais seguro que seja o protocolo anestésico adotado para uma cesariana, todos os fármacos possuem a capacidade de atravessar rapidamente a barreira placentária canina, causando depressão das funções vitais em graus variados, fator que também contribui para menor absorção pulmonar e adaptação respiratória (Santos *et al*., 2005; Silva *et al*., 2015).

Por tais motivos, o risco de morbidades respiratórias ao nascimento, tais como a Taquipnéia Transitória do Recém-Nascido e a Síndrome do Desconforto Respiratório, associadas principalmente à insatisfatória absorção de fluído pulmonar e síntese de surfactante, respectivamente, são de duas a três vezes maiores em

neonatos nascidos por cesariana. Além disso, este risco é ainda maior quando a cesariana é realizada previamente ao início do trabalho de parto (Tefera *et al.*, 2020).

Atualmente, a casuística de cesarianas em cães cresce simultaneamente ao aumento da criação dos mesmos. A cesariana pode ser indicada para cadelas de raças nas quais há incompatibilidade de diâmetros materno-fetais (principalmente para raças braquicefálicas), cadelas com histórico anterior de distocia ou cesariana prévia, ninhadas muito numerosas ou de feto único, além de cadelas nulíparas com idade igual ou superior a seis anos (Smith, 2007). Entretanto, as taxas de mortalidade neonatal para a espécie variam de acordo com a condição do parto; sendo 5,5% para eutocias, 33% para distocia e entre 6 e 11% para cesariana eletiva ou emergencial (Moon *et al.*, 2001).

## 2.2 O estresse oxidativo no período neonatal e terapias antioxidantes

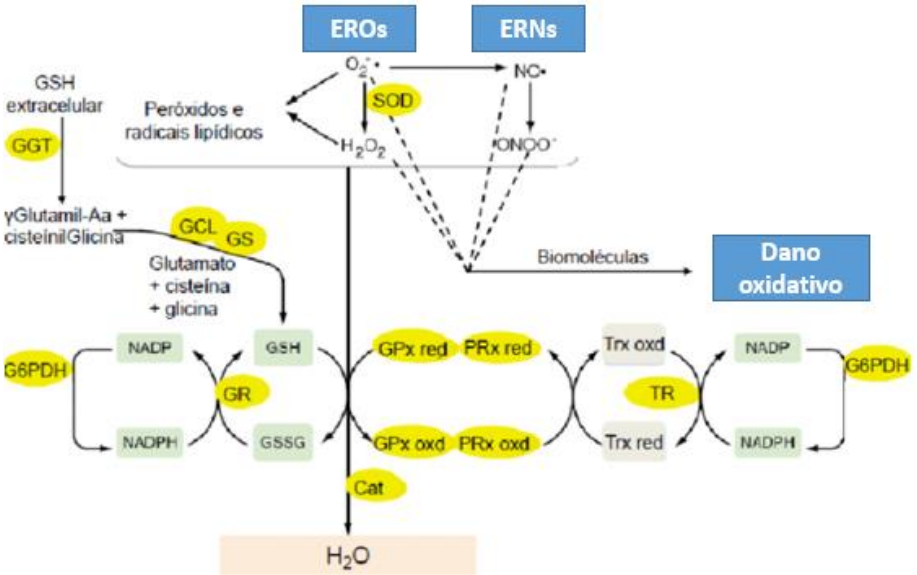
Os radicais livres são considerados substâncias com um ou mais elétrons não pareados na órbita externa, os quais encontram-se normalmente centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, sendo denominados espécies reativas ao oxigênio (EROs) ou ao nitrogênio (ERNs). Tais elementos são gerados durante o metabolismo das células eucariontes e são provenientes da cadeia respiratória mitocondrial (Rodrigues, 1998; Barreiros *et al.*, 2006).

Dentre as principais EROs, destacam-se o ânion superóxido ($O_2$-), o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e o radical hidroxila (OH-). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, apesar de serem capazes de lesionar proteínas, lipídeos e DNA, são considerados espécies pouco reativas. Entretanto, o radical hidroxila é altamente deletério, por haver dificuldade em inativá-lo *in vivo,* decorrente da sua meia-vida muito curta, somada à ausência de um antioxidante específico que debele sua formação (Rodrigues, 1998; Barreiros *et al.*, 2006).

Dentre as ERNs, incluem-se o óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxinitritos (Barreiros *et al.*, 2006). O óxido nítrico quando produzido exacerbadamente, também pode reagir com as EROS, como o ânion

superóxido, produzindo o peroxinitrito. Além disso, sob condições patológicas, o desacoplamento das ERNs pode resultar na produção direta de superóxido em excesso (Berkelhamer et al., 2014) (figura 1). Embora o peroxinitrito e o peróxido de hidrogênio não sejam considerados radicais livres (pois não possuem elétron despareado), ambos são reativos, podendo induzir reações radicalares (Barreiros *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2010) (figura 1).

**Figura 1 - Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adaptado de KENSLER et al. (2007). São Paulo, 2022.**




EROs – espécies reativas ao oxigênio; ERNs – espécies reativas ao nitrogênio; O 2 .-Ânion superóxido; NO .-Óxido nítrico; ONOO .-Peróxido nitrito; H 2 O 2-Peróxido de Hidrogênio; SOD-Superóxido Dismutase; GGT-gamma-glutamil transpeptidase; GCL-gamma-glutamilcisteinil ligase; GS-glutationa sintetase; G6PDH-glicose-6 fosfato desidrogenase; GR-glutationa redutase; GPx red-Glutationa Peroxidase reduzida; GPx oxd-glutationa peroxidase oxidada; Prx red-peroxiredoxina reduzida; Prx oxd-peroxiredoxina oxidada; CAT-Catalase; GSHglutationa reduzida; GSSG-disulfeto de glutationa; NADP-nicodinamina adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; NADP-nicodinamina adenina dinucleótido fosfato oxidado; NADP-nicodinamina adenina dinucleótido fosfato reduzido; Trx oxd-tioredoxina oxidada; Trx red-tioredoxina reduzida; TR-tioredoxina redutase.

Em situação fisiológica, a produção exacerbada de radicais livres é equilibrada pelo mecanismo antioxidante, o qual é classificado em enzimático e não enzimático. Antioxidantes enzimáticos são aqueles que atuam diretamente na metabolização das EROs, sem serem consumidos ao final do processo, como por

exemplo, as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutationa Peroxidase (GPx) (Rodrigues, 1998; Barreiros *et al*., 2006).

A SOD é responsável por transformar uma molécula de $O_2$-, resultando na formação de uma molécula de $H_2O_2$ (figura 1). Devido ao produto de sua ação (peróxido de hidrogênio), a SOD é considerada um pró-oxidante. Posteriormente, a catalase (CAT) ou a GPx agem desintegrando a molécula de $H_2O_2$ previamente formada, transformando-a em uma molécula de $H_2O$ e $O_2$, ou em duas moléculas de $H_2O$, respectivamente (figura 1) (Rodrigues, 1998; Barreiros *et al*., 2006). Além disso, a GPx utiliza a Glutationa Reduzida (GSH) para redução do peróxido de hidrogênio em água, formando a Glutationa Oxidada (GSSG). Posteriormente, a GSSG é reduzida a GSH pela Glutationa Redutase (GSR), utilizando NADPH como co-fator (figura 1) (Huber *et al.*, 2008).

Já os antioxidantes não enzimáticos são substâncias exógenas consideradas essenciais, incluindo especialmente compostos provenientes da dieta, como as vitaminas A (retinol e carotenoides), C (ácido ascórbico) e E (tocoferol); zinco, selênio e cobre, que por sua vez, protegem os lipídeos e o DNA contra os danos causados pelo excesso das EROs e ERNs (Nogueira *et al.* 2010).

A GSH também faz parte dos antioxidantes não enzimáticos, sendo o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. A GSH pode atuar como substrato para a ação da GPx; reduzindo a forma oxidada da vitamina C; mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional e detoxificando aldeídos reativos, como o malondeaildeído. Ainda, sua função antioxidante depende da sua relação entre a forma reduzida e oxidada, sendo ambas importantes e necessárias na atuação da GPx, por exemplo (Pastore *et al.*, 2003).

Os radicais livres, quando em concentrações adequadas, e em equilíbrio com o sistema antioxidante, desempenham papel fisiológico cumprindo funções relevantes para a regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas e geração de energia em forma de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons (Barreiros *et al.*, 2006). Berkelhamer et al., (2014) revisaram que a proteção fisiológica contra microrganismos depende do aumento do estresse oxidativo gerado por granulócitos e macrófagos; o metabolismo e a

desintoxicação de drogas envolvem respostas redox do fígado; e, de forma mais relevante para o cenário perinatal, o ON também desempenha um papel crítico na regulação do desenvolvimento pulmonar intrauterino e do tônus vascular pulmonar imediatamente após o nascimento.

Entretanto, quando em grandes quantidades, as EROS rompem a homeostase com os mecanismos antioxidantes, resultando em estresse oxidativo, o qual promove efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana, oxidação de proteínas, danos às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Além da lesão celular direta, as EROs são capazes de promover inflamação, resultando na liberação de mediadores inflamatórios e dano tecidual secundário. Da mesma forma, a produção excessiva de ERNs leva à nitração proteica, afetando a função das proteínas e alterando a homeostase celular (Berkelhamer et al., 2014).

Em neonatologia, os principais danos causados pelo estresse oxidativo são a asfixia perinatal, displasia broncopulmonar, enterite necrosante, hemorragia intracraniana; além de lesões celulares como peroxidação lipídica, alteração da permeabilidade vascular e alteração da estrutura de proteínas e ácidos nucleicos (Rodrigues, 1998), além de alterações funcionais gastrointestinais como a redução da absorção intestinal e consequente falha de transferência passiva de nutrientes e imunoglobulinas (Mutinati *et al.*, 2014). Ademais, Berkelhamer e colaboradores (2014) ressaltam que, o excesso de geração de EROs e ERNs causa lesão pulmonar difusa e, no pulmão ainda imaturo, comprometem o desenvolvimento alveolar e vascular, o que influencia de forma negativa na transição neonatal.

Ao nascimento, os neonatos de todas as espécies, especialmente os prematuros, são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo, por aumento exponencial das EROs decorrente da transição do ambiente intrauterino hipoxêmico, com cerca de 20 a 25 mmHg de tensão de oxigênio para um ambiente extra-uterino hiperóxico, com cerca de 100 mmHg de tensão de oxigênio (Sgorbini *et al.*, 2015). Tais condições, somadas à imaturidade do sistema antioxidante neonatal, propiciam o estresse oxidativo nesta fase (Buonocore *et al.*, 2002).

Para uma adequada adaptação neonatal ao ambiente rico em oxigênio, o neonato necessita desenvolver, além dos inúmeros ajustes metabólicos ao nascimento, defesas antioxidantes capazes de combater a produção das EROs na transição para a respiração pulmonar após o nascimento (Rodrigues, 1998). Almeida *et al.* (2022) constataram que neonatos caninos, nascidos por cesariana eletiva e parto vaginal, apresentaram correlação positiva entre o estresse oxidativo e o sistema antioxidante. Também, apresentaram capacidade adaptativa com elevação da atividade antioxidante enzimática nos primeiros dias de vida, de forma semelhante ao relatado em bezerros (Gaal *et al.*, 2006; Abuelo *et al.*, 2014; Ranade *et al.*, 2014) e potros (Souza *et al.,* 2021).

Durante o período de transição feto-neonatal, quando não há adaptação respiratória satisfatória, o fornecimento de oxigênio é necessário para manutenção da troca gasosa pulmonar (Vannucchi e Abreu, 2017). Entretanto, embora essencial para o suporte respiratório, a respiração assistida em neonatos associada ao uso de altas concentrações de oxigênio agrava o desbalanço oxidativo, potencializando os efeitos deletérios das EROs (Rodrigues, 1998). Portanto, especialmente quando a oxigenoterapia faz-se necessária, o desenvolvimento de defesas antioxidantes é de suma importância neste período. Em função da gravidade das lesões oxidativas, a suplementação antioxidante materna ou neonatal pode ser recomendada, a fim de prevenir ou atenuar os danos causados pelo desbalanço oxidativo (Mutinati *et al.*, 2014).

Em humanos, a placenta apresenta um importante papel antioxidante para o feto, diminuindo a passagem dos agentes oxidantes para a circulação fetal, aumentando a concentração destes agentes na circulação materna no momento do parto (Qanungo e Mukherjea, 2000; Lista *et al.*, 2010; Sgorbini *et al.*, 2015). Na espécie canina, observou-se relação do sistema antioxidante e do estresse oxidativo materno e neonatal durante o período perinatal, podendo ser atribuída à mecanismos antioxidantes placentários, entretanto, mais estudos são necessários para compreender a influência placentária na homeostase oxidativa fetal (Almeida *et al*., 2021).

Em Medicina, diversas terapias com antioxidantes enzimáticos têm sido relatadas em patologias respiratórias. A suplementação intra-traqueal ou inalatória da SOD demonstrou-se efetiva na prevenção de injúrias pulmonares decorrentes da

hiperóxia prolongada, como a Broncodisplasia Pulmonar, por exemplo, aumentando a atividade desta enzima no tecido pulmonar, e diminuindo as lesões oxidativas (Davis, 2002; Lee e Davis, 2011; Berkelhamer e Farrow, 2014; Poggi e Dani, 2014).

Ainda, Poggi e Dani (2014), em revisão, salientaram outros diversos estudos do tratamento com suplementação de catalase e superóxido dismutase, visando a melhora da função pulmonar, obtentores de resultados positivos com animais (tabela 1).

**Tabela 1** – Efeito da administração exógena de SOD/CAT ou superexpressão de SOD em modelos animais de lesão pulmonar causada por hiperóxia (adaptado de Poggi e Dani, 2014). São Paulo, 2022.

| Modelos experimentais | Tratamento e via de administração | Resultados obtidos |
|---|---|---|
| Ratos submetidos a hiperóxia | Formulação: SOD e CAT bovinos encapsulados em lipossomas<br>Via: IV<br>Momento: antes e durante a exposição | Taxa de sobrevivência aumentada e derrame pleural reduzido no grupo de tratamento vs controle |
| Ratos submetidos a hiperóxia | Formulação: SOD bovino encapsulado em lipossomas e CAT<br>Via: ET<br>Tempo: antes da exposição | Taxa de sobrevivência aumentada e histologia pulmonar preservada no grupo de tratamento vs controles. |
| Leitões, hiperventilados e hiperóxicos | Formulação: rhSOD<br>Via: ET<br>Tempo: no início da exposição | Redução da atividade quimiotática de neutrófilos, contagem total de células, atividade da elastase e albumina em aspirados traqueais dos animais tratados vs controles. |
| Coelhos, tecido pulmonar desafiado com xantina e xantina oxidase | Formulação: SOD bovino encapsulado em lipossomas e CAT<br>Via: ET | Coeficiente de filtração pulmonar preservado em animais tratados vs controles. |
| Camundongos transgênicos, hiperóxicos | Superexpressão de SOD3 direcionada ao pulmão | Neutrófilos pulmonares e GSH oxidada reduzidos, superfície alveolar e densidade do volume pulmonar aumentadas em animais transgênicos vs controles |
| Camundongos transgênicos, hiperóxicos | Superexpressão de SOD3 direcionada ao pulmão | Preservação da proliferação do epitélio alveolar e bronquiolar, redução do dano ao DNA e preservação da expressão da proteína apical nas células tipo I em animais transgênicos vs controles |

| Modelos experimentais | Tratamento e via de administração | Resultados obtidos |
|---|---|---|
| Coelhos submetidos a hiperóxia | Transfecção com plasmídeo contendo rhSOD3<br>Via: AER | Aumento da expressão pulmonar de cGMP e diminuição da expressão pulmonar de NF-kB em animais tratados vs controles. |
| Camundongos transgênicos, hiperóxicos | Superexpressão de SOD3 direcionado ao pulmão + Antileucinato por 7 dias<br>Via: IP | Neutrófilos pulmonares e GSH oxidada reduzidos em aspirados traqueais de animais transgênicos tratados vs animais não transgênicos tratados ou transgênicos não tratados. |

IV – intravenoso, ET – intratraqueal, IP – intraperitoneal, AER – aerossol.

Ainda, a utilização da GPx foi relatada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica secundária ao tabaco, apresentando papel protetor pulmonar, aumentando a capacidade antioxidante e diminuindo a inflamação e enfisema induzidos pela fumaça do cigarro (Vlahos e Bozinovski, 2013).

Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, diversos estudos em neonatos humanos sugerem que a terapia suplementar com melatonina, n-acetilcisteína, eritropoietina, sulfato de magnésio e alopurinol reduzem os efeitos deletérios da hiperóxia no cérebro e nos pulmões de recém-nascidos prematuros acometidos com displasia broncopulmonar e a síndrome de distrição respiratória (Gonzalez-Candia *et al.*, 2019; Solevåg *et al.*, 2019; Martini *et al.*, 2020; Falsaperla *et al.*, 2020; Marseglia *et al.*, 2021).

Há evidências de que a GSH está envolvida na modulação celular de resposta inflamatória, e por isso apresenta-se diminuída em várias doenças inflamatórias pulmonares (Rahman e Macnee, 2000). Em pacientes asmáticos, a concentração plasmática de GSH e a capacidade antioxidante total correlacionaram positivamente com a função pulmonar, indicando que os antioxidantes desempenham papel favorável no funcionamento pulmonar (Yoon *et al.*, 2012; Khatri *et al.*, 2014). Ainda, a suplementação de GSH via oral ou inalatória também melhorou a função pulmonar e diminuiu o estresse oxidativo nos quadros de fibrose cística (Ciofu *et al.*, 2020).

Na Medicina Veterinária, a suplementação antioxidante com o objetivo de melhorar a adaptação pulmonar durante a transição feto-neonatal em cães ainda não foi relatada. Entretanto, Almeida *et al.*, 2022, observaram que a atividade antioxidante total sérica de neonatos caninos correlacionou-se positivamente com parâmetros de adaptação respiratória como a coloração de mucosa, saturação periférica de oxigênio e frequência respiratória, sugerindo que os antioxidantes podem desempenhar efeito benéfico na adaptação pulmonar pós-natal. Desta forma, justifica-se o estudo acerca da influência da suplementação materna pré-natal com GSH na adaptação respiratória de neonatos termos nascidos por cesariana eletiva.

# *Hipótese*

# 3 HIPÓTESE

A administração materna pré-natal de Glutationa Reduzida favorece a adaptação pulmonar de neonatos caninos nascidos por cesariana eletiva e melhora a capacidade antioxidante dos mesmos.

# *Objetivos*

# 4 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1) Comparar o efeito da administração materna pré-natal em diferentes doses de Glutationa Reduzida (0, 5, 10 e 20 mg/kg) sobre o metabolismo redox materno e neonatal, bem como a vitalidade neonatal nas primeiras 24 horas de vida.

2) Determinar a melhor dose de Glutationa Reduzida para a suplementação materna pré-natal.

# *Material e métodos*

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado obedecendo as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob protocolo de número CEUA 8457030918, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos tutores.

## 5.1 Animais e grupos experimentais

Foram selecionadas 22 cadelas gestantes, de raças e portes variados, com idade reprodutiva entre 2 e 6 anos, oriundas de canis particulares e proprietários. Embora o manejo geral das fêmeas não tenha sido uniforme, todas eram alimentadas com ração comercial de qualidade Super Premium, em quantidade controlada de acordo com o sugerido para fase gestacional, sem adição de quaisquer suplementações alimentares. As cadelas permaneciam em regime de criação livre, sem confinamento em baias ou submetidas a estresse ambiental ou térmico. Ademais, no momento do experimento, todas as cadelas estavam hígidas e em adequado escore corporal, não apresentando qualquer comorbidade durante a gestação.

As fêmeas e seus respectivos neonatos (no máximo dois neonatos por fêmea) foram alocados randomicamente em quatro grupos experimentais de acordo com a concentração de GSH utilizada na suplementação pré-natal por peso materno:

- Grupo controle (n=7): fêmeas para as quais foi administrada solução placebo contendo apenas cloreto de sódio 0,9%.
- Grupo 5 (n=5): fêmeas para as quais foi administrada GSH na dose de 5 mg/kg.
- Grupo 10 (n=5): fêmeas para as quais foi administrada GSH na dose de 10 mg/kg.
- Grupo 20 (n=5): fêmeas para as quais foi administrada GSH na dose de 20 mg/kg.

O perfil e a distribuição dos animais nos grupos experimentais estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2 –** Número de neonatos avaliados, idade, raça e distribuição nos grupos experimentais das fêmeas selecionadas (n=22). São Paulo, 2022.

| Fêmeas | Neonatos avaliados | Raça | Idade (anos) | Grupo Experimental |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | Labrador Retriever | 5 | 5 |
| 2 | 2 | Terra Nova | 6 | 20 |
| 3 | 1 | Labrador Retriever | 4 | Controle |
| 4 | 2 | Terra Nova | 4 | 10 |
| 5 | 2 | Golden Retriever | 6 | Controle |
| 6 | 2 | Labrador Retriever | 5 | 10 |
| 7 | 1 | Labrador Retriever | 5 | 20 |
| 8 | 2 | Staffordshire Bull Terrier | 5 | 5 |
| 9 | 2 | Labrador Retriever | 5 | 20 |
| 10 | 2 | Labrador Retriever | 3,5 | 10 |
| 11 | 2 | Labrador Retriever | 2 | Controle |
| 12 | 2 | Bulldog Francês | 3 | 5 |
| 13 | 2 | Terra Nova | 6 | Controle |
| 14 | 1 | Bulldog Inglês | 2 | Controle |
| 15 | 2 | Bulldog Inglês | 2 | Controle |
| 16 | 2 | Bulldog Inglês | 4 | Controle |
| 17 | 2 | Bulldog Francês | 3 | 20 |
| 18 | 2 | Staffordshire Bull Terrier | 2 | 10 |
| 19 | 2 | Bulldog Francês | 4 | 10 |
| 20 | 2 | American Bully | 3 | 20 |
| 21 | 2 | Staffordshire Bull Terrier | 2 | 5 |
| 22 | 2 | American Bully | 3 | 5 |

### 5.1.2 Delineamento experimental

Todas as fêmeas utilizadas neste estudo foram submetidas à cesariana eletiva a termo, apenas quando a progesterona sérica atingiu valor igual ou inferior a 2 ng/mL (Johnston *et al.*, 2001), sem início da fase expulsiva de parto. A suplementação materna pré-natal com diferentes concentrações de GSH (0, 5, 10 ou 20 mg/kg) foi administrada lentamente por via intravenosa após a canulação da veia cefálica das cadelas, sempre previamente à indução anestésica.

A GSH e as soluções placebo (cloreto de sódio 0,9%) foram aviadas para uso intravenoso por uma farmácia de manipulação (Farmatec Laboratório de Manipulação, São Paulo), apresentando sempre característica incolor, inodora e envasadas em ampolas de vidro âmbar na concentração de 50 mg/mL. O presente estudo foi delineado como duplo-cego, de modo que toda a equipe de análise clínica envolvida não soubesse, durante todo o tempo experimental, a qual grupo pertenciam as mães e seus respectivos neonatos.

Adotou-se sempre o mesmo protocolo anestésico e técnica cirúrgica, compreendido por: tranquilização com fentanil (2 mcg/kg) por via intramuscular; indução anestésica com propofol (5 mg/kg) por via endovenosa lenta; bloqueio epidural no espaço intervertebral lombossacro com associação de morfina (0,1 mg/kg) e lidocaína (4 mg/kg); e manutenção com isoflurano na concentração de 1,0 a 1,3% em oxigênio. Após a anestesia, tricotomia e antissepsia da região abdominal, o útero foi acessado por celiotomia e, após exteriorização uterina, foi realizada a histerotomia para retirada dos filhotes. A ruptura manual dos envoltórios fetais foi feita rapidamente, seguida do clampeamento do cordão umbilical. Os filhotes foram, então, submetidos aos primeiros cuidados e avaliações. Após a retirada dos filhotes, as fêmeas foram mantidas sob anestesia inalatória com isoflurano até a histero e celiorrafia.

Após a recuperação anestésica das fêmeas, os filhotes foram apresentados para reconhecimento materno e colostragem em livre demanda, sempre supervisionados por um médico veterinário. Todas as fêmeas foram medicadas no pós-operatório com cefalexina (30 mg/kg) a cada 12 horas por sete dias; cloridrato de tramadol (2 mg/kg) e dipirona sódica (25 mg/kg) a cada oito horas por cinco dias.

As determinações das variáveis maternas e neonatais seguiram um padrão de repetições ao longo do tempo, independente do grupo experimental, em períodos previamente definidos, conforme as figuras 2 e 3, respectivamente.

**Figura 2 –** Delineamento experimental das avaliações maternas, independente do grupo experimental. São Paulo, 2022.

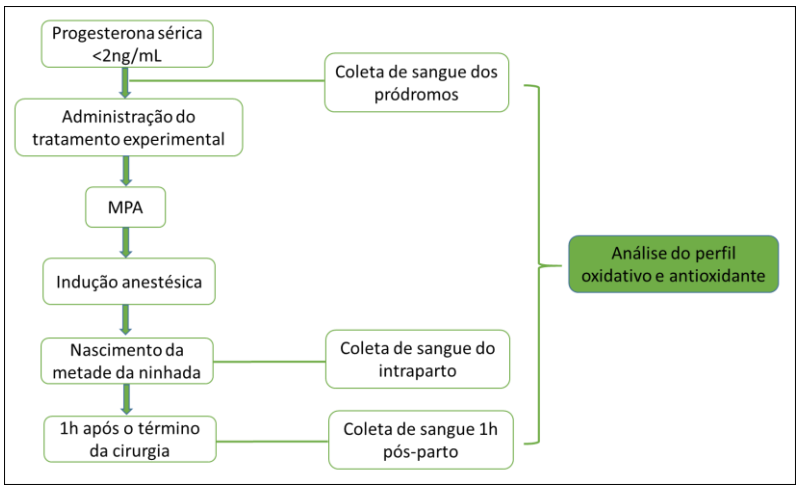
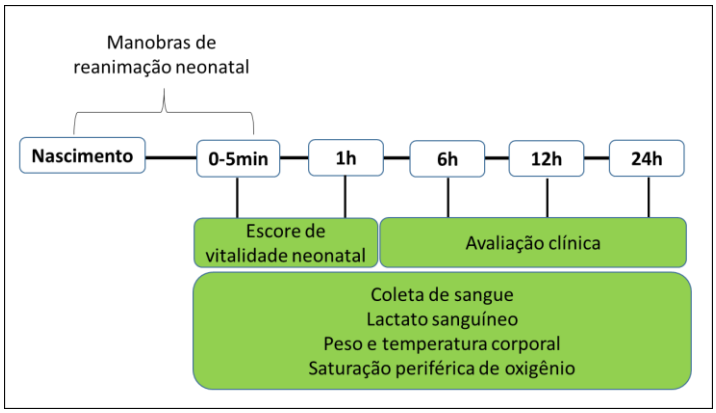



**Figura 3 -** Delineamento experimental das avaliações neonatais, independente do grupo experimental. São Paulo, 2022.




O momento experimental dos pródromos foi definido sempre antes do tratamento, da administração da MPA e indução anestésica. O intra-parto foi considerado a partir do nascimento da metade da ninhada, determinado a partir da exposição e visibilização da quantidade fetal nos cornos uterinos.

Ademais, o tempo decorrido entre a administração do tratamento e: o início da cirurgia, o nascimento do primeiro e do segundo neonato avaliados, a metade e o final da cirurgia; e o número de filhotes nascidos foram considerados.

### 5.1.3 Coleta e armazenamento das amostras de sangue

Aproximadamente 1,5 mL de sangue foram obtidos através da punção das veias cefálica e jugular das cadelas e dos neonatos, respectivamente. As amostras foram transferidas imediatamente para tubos com gel separador e centrifugadas a 1500 G por 10 minutos. O soro obtido foi então armazenado em microtubos de polipropileno (Eppendorf®) em freezer a -20ºC até o processamento. As amostras foram utilizadas para a determinação do perfil oxidativo e antioxidante sérico das mães e dos neonatos, além da determinação da lactatemia sanguínea apenas nos neonatos.

### 5.1.4 Análise do metabolismo redox

A avaliação do metabolismo redox deu-se por meio da determinação da peroxidação lipídica e oxidação proteica; dosagem indireta do óxido nítrico; determinação da atividade das enzimas superóxido dismutade e glutationa peroxidase; dosagem de tióis totais, indicando indiretamente a concentração de glutationa reduzida; e a determinação da capacidade antioxidante total sérica dos neonatos e das fêmeas.

O perfil de peroxidação lipídica foi realizado por meio da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo protocolo descrito por Nichi *et al.* (2007), o qual baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea. Para esta reação, foi adicionado 400 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA – T 6399-100g Sigma®) a 4°C em alíquotas de 200 µL de soro sanguíneo, para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação (20.000 g, 5 ºC, 15 minutos), foi recuperado 500 µL do sobrenadante, e então diluído em 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA, 1% diluído em 0,05 M de

hidróxido de sódio), mantido em banho maria a 100ºC, por 15 minutos e imediatamente resfriado em banho de gelo a 0ºC, para interrupção da reação química. A concentração de TBARS foi quantificada 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.

Para a determinação da oxidação de proteínas, seguiu-se a metodologia proposta por Levine *et al.* (1990) e Odetti *et al.* (1996), modificada e padronizada para soro sanguíneo (Almeida *et al*., 2022), para a qual 25 µL de soro sanguíneo foram adicionados a 25 µL de Ácido Tricloroacético 20%. As análises foram feitas em duplicata (denominadas A e B) para que cada alíquota de amostra tenha o seu branco. Em seguida, as amostras (A e B) foram centrifugadas por 10 minutos a 1100 g e 5ºC e o sobrenadante foi descartado.

Após, foi adicionado 500 µL de 2,4 Dinitrofenilhidrazina 10 mM (DNFH - D 199303 – 100g Sigma®) nas alíquotas A, e nas alíquotas B de cada amostra foi adicionado 500 µL de ácido clorídrico 2M (HCL – 38283-1EA - Sigma®) e ambos foram mantidos por 1 hora à 37ºC, agitando a cada 15 minutos em vórtex. Então, foi adicionado 500 µL de TCA 20%, centrifugado por 5 minutos a 1100 g e a 5 ºC e descartado o sobrenadante.

Após, foi adicionado 1 mL de acetato de etila/etanol (1:1) e as amostras permaneceram 10 minutos em temperatura ambiente, e então, foram novamente centrifugadas a 1100 g por 15 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Posteriormente, o passo anterior foi repetido, e então, o *pellet* foi ressuspendido em 2 mL de NaOH 1M (Dinâmica®) e colocados em banho seco a 37º C por 15 minutos.

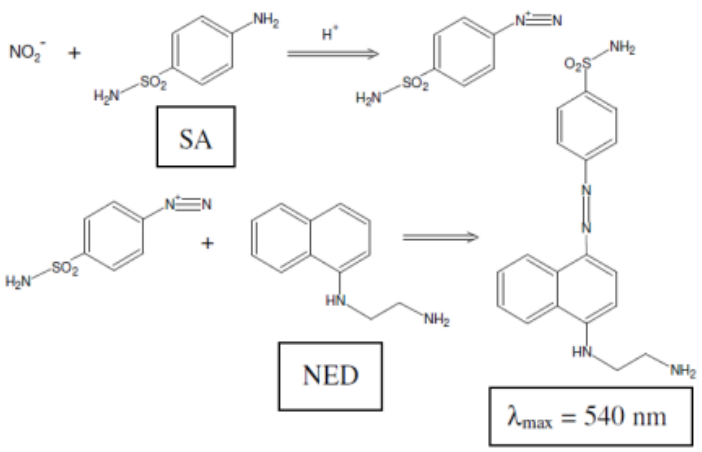
Passado o tempo, as amostras foram submetidas novamente à centrifugação durante cinco minutos a 1100 g em temperatura ambiente. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para cubetas acrílicas de 1,5 mL apropriadas para leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences), e a leitura foi realizada à absorbância de 380 nm. Dados os resultados, a diferença entre as alíquotas de cada amostra (A – B) foi obtida.

Para chegar ao resultado final da oxidação de proteínas, os valores (A – B) foram corrigidos conforme a concentração proteica de cada amostra, obtidas a partir do protocolo descrito por Lowry et al. (1951), para o qual 5 µL de cada amostra foram diluídos em 495 µL de NaOH 0,1M para, em seguida reagir com 2,5 mL de Reagente Alcalino de Cooper por 10 minutos em temperatura ambiente. Após 10 minutos, foi adicionado 250 µL de reagente de Folin diluído e as amostras foram imediatamente vortexadas e ficaram em descanso por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®) em comprimento de onda de 660 nm. Os resultados foram expressos em mg de carbonil/mg de proteínas.

Para a dosagem indireta de óxido nítrico (ON) foi realizada a concentração de nitratos e nitritos no soro, baseando-se na reação de Griess, utilizando analisador automatizado, de acordo com a técnica descrita por Sun *et al*. (2003). Utilizou-se amostras desproteinizadas de soro para realizar a reação de Griess, posteriormente à reação de redução dos nitratos presentes nas amostras à nitrito.

A reação de Griess quantifica indiretamente a concentração de nitrito na amostra pela diazotização dos compostos nitrogenados, formando um composto estável 4-[[4-[(2-aminoetil)amino]-1-naftil]azo]-benzenossulfonamida, que, por sua vez, tem a mesma proporção estequiométrica do nitrito (Figura 5). O nitrito é formado pela oxidação do óxido nítrico (2 $NO + O_2 \rightarrow 2\ NO_2^-$ ) e, segundo a proporção estequiométrica, ambos possuem concentrações equivalentes.

**Figura 4** - Esquematização da reação de Griess (SUN et al., 2003).




SA – sulfanilamida, NED - N(1-naftil)etilenodiamina.

O processo de desproteinização ocorreu pela adição de 40 µL de sulfato de zinco 30%, diluído em ácido clorídrico (1 N), e 20 µL de soro a um microtubo e, em seguida, foi submetido a centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos, coletando-se o sobrenadante ao final deste processo. Posteriormente, para a redução de nitratos à nitritos, adicionou-se 50 µL da amostra desproteinizada e 50 µL de cloreto de vanádio 8 mg/mL, diluído em ácido clorídrico (1 N), à uma microplaca.

A partir da adição deste reagente até o momento da leitura da absorbância, a placa foi mantida na ausência de luminosidade. Em seguida, para iniciar a reação de griess, adicionou-se 25 µL de sulfanilamida (SA) 2%, diluída em ácido fosfórico 5%, e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Adicinou-se 25 µL N(1-naftil)etilenodiamina (NED) 0,2% (diluído em água deionizada) e, por fim, a microplaca foi incubada a 37 ºC por 20 minutos. Utilizou-se o leitor de microplaca automatizado Biotek EL808® para a leitura da absorbância da amostra, utilizando o comprimento de onda de 540 nm.

Para cada placa foi feita, em duplicata, uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito para referência, utilizando-se uma solução de nitrato de sódio em água deionizada a fim de estabelecer uma equação linear para a posterior determinação indireta da concentração de óxido nítrico através da absorbância. Por fim, utilizou-se equação linear gerada pela curva padrão para determinar a concentração de nitritos na amostra.

A determinação da atividade da GPx seguiu a técnica descrita por Nichi *et al.* (2007), para a qual 50 µL de soro foram adicionados a 10 µL de solução de azida sódica 0,25 M, 10 µL de solução de GSSG redutase, 50 µL de solução de glutationa reduzida 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-butilhidroxiperóxido. 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 mM-1cm-1), conforme equação a seguir:

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

A determinação da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi realizada segundo a técnica proposta por Flohe e Otting (1984), medida indiretamente por meio da taxa de redução do citocromo C pelo $O_2^-$ . A atividade enzimática foi medida determinando-se a taxa de diminuição da redução do citocromo C. O meio de reação contém 1 µL de citocromo C (Sigma®, C3381), 50 µL de xantina (Sigma®, X 2252), 100 µL de EDTA e 50 µL de tampão fosfato de sódio (Sigma®, S 9638) a pH 7,8. Realizou-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 1 unidade de atividade da SOD total corresponde a 50% deste valor. O ensaio foi realizado em 550 nm a 25 ºC. O cálculo da concentração de SOD na amostra seguiu a fórmula a seguir, e o resultado foi expresso em U/mL.

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

A determinação da capacidade antioxidante total do soro (TAC) foi realizada por método colorimétrico por meio do kit comercial OxiSelect™ (Cell Biolabs INC, Califórnia, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. O teste mediu a capacidade total de antioxidante das amostras, baseando-se na redução do cobre$^{2+}$ para o cobre$^{1+}$ por antioxidantes, como o ácido úrico, por exemplo. Após a redução, o cobre I reage ainda com um reagente cromógeno de acoplamento que produz uma cor com absorbância máxima de 490 nm, a reação é então interrompida por adição de uma solução *stop*, e a leitura é realizada em uma placa de 96 poços no comprimento de onda de 490 nm. As amostras foram comparadas com uma curva padrão conhecida de ácido úrico e a capacidade antioxidante foi determinada por comparação com os padrões de ácido úrico. Os resultados foram expressos como "equivalentes de redução de cobre µM" (Copper reducing equivalentes - CRE).

A concentração de tióis totais do soro, objetivando-se a determinação indireta de GSH, foi realizada a partir da técnica descrita por Hu (1994), para a qual

os grupos tióis interagem com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, ou Reagente de Ellman), promovendo coloração amarela.

Para tal, uma alíquota de 50 µL de soro foi misturada a 1 mL de um tampão Tris-EDTA (Tris base 0,25 M e EDTA 20 mM, pH 8,2) em uma cubeta acrílica para leitura espectrofotométrica. A absorbância foi então lida a 412 nm (A). Posteriormente, 20 µL de DTNB (10mM em etanol absoluto) foi adicionado e após 15 minutos, em temperatura ambiente, a absorbância foi lida novamente a 412 nm (B). A diferença entre A e B foi, então, calculada, e o resultado final foi determinado a partir de uma curva padrão com sete concentrações diferentes de GSH (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM). O resultado final foi expresso em µM.

### 5.1.5 Escore de vitalidade e avaliação clínica neonatal

Imediatamente após o nascimento, os neonatos foram submetidos aos primeiros passos de reanimação neonatal descrito por (Vannucchi e Abreu, 2015), simultaneamente à avaliação de vitalidade neonatal. Vale ressaltar que, neonatos que necessitaram da administração de quaisquer drogas ou oxigenioterapia durante o protocolo de reanimação foram excluídos do presente experimento.

Para a avaliação da vitalidade neonatal na espécie canina, são consideradas as variáveis: frequência cardíaca, frequência respiratória concomitante à minuciosa auscultação pulmonar, tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração das mucosas aparentes (Silva *et al.*, 2008; Veronesi, 2016). Atribui-se, então, uma nota de 0 a 2 para cada variável, conforme Tabela 3, e a somatória de todas as variáveis contemplam a nota do escore de vitalidade.

**Tabela 3** - Parâmetros adotados para avaliação do escore Apgar adaptado à espécie canina (adaptado de Silva *et al.*, 2008), São Paulo, 2022.

| Variáveis | Pontuação | | |
|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 |
| Frequência cardíaca | Ausente | Presente, porém bradicárdica | Presente e normal (200- |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | (<200 bpm) | 250 bpm) |
| Frequência respiratória | Ausente | Irregular (<15 mpm ou >40 mpm) | Regular e vocalização (15-40 mpm) |
| Tônus muscular | Flacidez | Alguma flexão | Flexão |
| Irritabilidade reflexa | Ausente | Algum movimento | Hiperatividade |
| Coloração de mucosa | Cianose e palidez | Cianose | Rósea |

bpm – batimentos por minuto, mpm – movimentos por minuto.

Ao nascimento, após 1, 6, 12 e 24 horas do nascimento, foram avaliadas as variáveis: frequências cardíaca e respiratória, escore de tônus muscular (0-2), escore de irritabilidade reflexa (0-2) e escore de coloração das mucosas (0-2). Ademais, a aferição da temperatura corporal foi realizada em todos os momentos da avaliação clínica neonatal com termômetro digital.

### 5.1.6 Peso corporal

O peso ao nascimento em neonatos caninos apresenta grande variação entre diferentes portes e raças, além do tamanho da ninhada. Ainda, sabe-se que nas primeiras 24 horas de vida o peso corporal pode diminuir até 10% do valor ao nascimento, devido à desidratação inicial fisiológica (Johnston *et al.*, 2001). Considerando tais informações, a variável do peso corporal foi transformada em porcentagem de ganho ou perda às 24h de vida.

O peso corporal foi avaliado por meio de balança digital pediátrica Mobily Baby (Balmak®), com capacidade de 5 g a 25 kg, em todos os momentos de avaliação clínica do neonato.

### 5.1.7 Saturação periférica de oxigênio

A oximetria de pulso é uma técnica não invasiva e de fácil uso, capaz de avaliar em tempo real a saturação parcial de oxigênio. Emprega-se o termo “saturação parcial” pois considera-se apenas as hemoglobinas disponíveis para o transporte de oxigênio. Sendo assim, o oxímetro de pulso indica a perfusão tecidual por meio da saturação periférica de oxigênio, podendo detectar rapidamente a progressão da hipóxia (Sinex, 1999).

A saturação periférica de oxigênio ($SpO^2$ %) foi determinada por meio do oxímetro de pulso portátil da marca OxiMax® N-65TM, posicionado em região anatômica da artéria femoral dos neonatos.

### 5.1.8 Lactatemia sanguínea

A dosagem da lactatemia sanguínea é considerada um bom indicador da perfusão tecidual, uma vez que é resultado do metabolismo celular anaeróbio. Sendo assim, altas concentrações de lactato sanguíneo indicam utilização de vias secundárias de oxigenação decorrente de eventos hipóxicos fisiológicos ou patológicos (Koliski *et al.*, 2005; Groppetti *et al.*, 2010). Ademais, a hiperlactatemia também está correlacionada com a morbimortalidade de neonatos caninos durante as 48 horas pós-nascimento (Lourenço e Machado, 2013).

O lactato sanguíneo foi determinado a partir da deposição de 25 µL de sangue venoso no aparelho de medição Accutrend® Plus (Roche Diagnóstica), após punção da veia jugular dos neonatos.

### 5.1.9 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os efeitos de grupo, tempo de avaliação, e as

interações entre esses fatores foram estimados pelas medidas repetidas ANOVA (procedimento MIXED do SAS).

As variáveis respostas neonatais foram determinadas pela média dos valores obtidos dos dois neonatos avaliados por fêmea. Diferenças entre os tratamentos foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos, de acordo com a normalidade residual (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. Sempre que um desses pressupostos não foi respeitado, os dados foram transformados. Se transformações não foram bem-sucedidas, foram utilizados os testes não paramétricos.

No caso de não ocorrer significativas interações, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir todos os momentos de avaliação, e, inversamente, os tempos de avaliação foram comparados combinando todos os grupos, caso contrário, as comparações foram realizadas tendo em conta os efeitos principais combinados. O teste LSD foi utilizado para comparar as diferenças de grupo e ao longo do tempo. Ademais, aplicou-se para as variáveis clínicas neonatais o teste de regressão linear em função das doses experimentais utilizadas.

As variáveis respostas maternas e neonatais foram também submetidas à análise de correlação de Pearson, considerando todos os grupos tratados e o grupo controle. Os resultados foram descritos como a média e erro padrão. O nível de significância utilizado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

# *Resultados*

# 6 RESULTADOS

## 6.1 Análises maternas

Não houve interação significativa (p<0,05) entre os grupos experimentais e o momento de avaliação para nenhuma das variáveis maternas (tabela 4). Portanto, foram comparadas diferenças entre grupos, independente dos tempos avaliados, e entre tempos avaliados, independente dos grupos. Observou-se diferença estatística apenas para as variáveis de peroxidação lipídica (entre grupos e entre tempos) e para a dosagem de óxido nítrico (apenas entre grupos).

**Tabela 4 -** Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Controle vs. 5 mg/kg vs. 10 mg/kg vs. 20 mg/kg) e tempo (Pródromos, Intraparto e 1h pós-parto) e sua interação para as variáveis experimentais maternas (p<0,05). São Paulo, 2022.

| Variáveis | Tratamento | Tempo | Tempo X Tratamento |
|---|---|---|---|
| Atividade da enzima SOD | 0.7639 | 0.9676 | 0.8566 |
| Atividade da enzima GPx | 0.6209 | 0.4405 | 0.5563 |
| Grau de peroxidação lipídica (TBARS) | 0.007 | 0.002 | 0.909 |
| Concentração de Tióis Totais (GSH) | 0.9954 | 0.8675 | 0.9987 |
| Capacidade antioxidante total (TAC) | 0.7498 | 0.9391 | 1 |
| Dosagem indireta de óxido nítrico (ON) | 0.1646 | 0.2616 | 0.9903 |
| Oxidação de proteínas | 0.8654 | 0.7206 | 0.897 |

SOD – Superóxido dismutase, GPx – Glutationa Peroxidase, GSH – Glutationa Reduzida, TAC – Capacidade antioxidante total, TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ON – óxido nítrico.

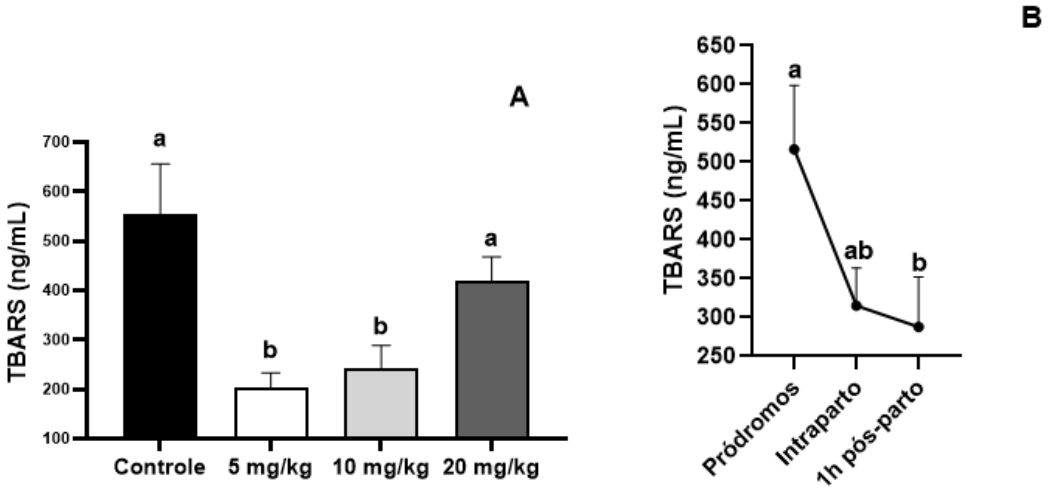
Além das análises maternas inerentes ao metabolismo redox, a média do tempo decorrido entre a administração do tratamento e: o início da cirurgia, o nascimento do primeiro e do segundo neonato avaliados, a metade e o final da cirurgia; e o número de filhotes nascidos foram determinados (tabela 5)

**Tabela 5 -** Valores e médias do tempo (min) decorrido entre a administração do tratamento e o início da cirurgia, o nascimento do primeiro e do segundo neonato avaliado, a metade e o final da cirurgia; e o número de filhotes nascidos em cada grupo experimental. São Paulo, 2022.

| Animal | Grupo | Tratamento e início da cirurgia | Tratamento e nascimento do neonato 1 | Tratamento e nascimento do neonato 2 | Tratamento e metade da cirurgia | Tratamento e final da cirurgia | Total de neonatos nascidos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 72 | 92 | 94 | 95 | 151 | 3 |
| 2 | 20 | 53 | 63 | 70 | 64 | 170 | 6 |
| 3 | Controle | 52 | 62 | . | 62 | 123 | 3 |
| 4 | 10 | 45 | 55 | 64 | 59 | 118 | 7 |
| 5 | Controle | 47 | 52 | 72 | 57 | 146 | 9 |
| 6 | 10 | 40 | 49 | 65 | 52 | 115 | 2 |
| 7 | 20 | 80 | 95 | . | 110 | 155 | 8 |
| 8 | 5 | 35 | 62 | 66 | 60 | 145 | 3 |
| 9 | 20 | 27 | 38 | 44 | 44 | 138 | 5 |
| 10 | 10 | 77 | 104 | 109 | 122 | 237 | 7 |
| 11 | Controle | 30 | 39 | 45 | 53 | 110 | 8 |
| 12 | 5 | 30 | 42 | 60 | 45 | 105 | 9 |
| 13 | Controle | 57 | 62 | 69 | 63 | 140 | 6 |
| 14 | Controle | 31 | 42 | . | 42 | 90 | 1 |
| 15 | Controle | 48 | 61 | 66 | 57 | 111 | 8 |
| 16 | Controle | 43 | 55 | 60 | 50 | 80 | 5 |
| 17 | 5 | 17 | 30 | 33 | 31 | 84 | 5 |
| 18 | 10 | 38 | 49 | 50 | 47 | 109 | 6 |
| 19 | 10 | 23 | 29 | 33 | 31 | 68 | 6 |
| 20 | 20 | 37 | 49 | 53 | 52 | 118 | 9 |
| 21 | 5 | 33 | 38 | 40 | 42 | 110 | 6 |
| 22 | 5 | 23 | 29 | 30 | 34 | 114 | 10 |
| Média | | 42,64 | 54,41 | 45,63 | 57,82 | 124,41 | 6 |

O Grupo Controle apresentou maior grau de peroxidação lipídica quando comparado aos grupos 5 e 10, porém não diferiu estatisticamente do Grupo 20 (figura 5 A). Ademais, o grau de peroxidação lipídica foi maior nos pródromos do parto quando comparado à 1h pós-parto (figura 5 B).

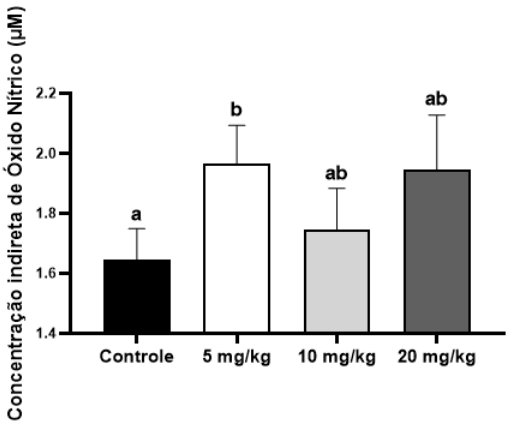
**Figura 5 -** Média e erro padrão para peroxidação lipídica (TBARS; ng/mL) materna entre os Grupos (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg) e entre os tempos experimentais (pródromos, intraparto e 1h pós-parto). São Paulo, 2022.




[a-b] indicam diferença estatística (p<0,05).

A concentração indireta de óxido nítrico no soro materno foi menor no Grupo Controle em comparação ao Grupo 5, entretanto, não diferiu estatisticamente dos demais grupos experimentais (figura 6).

**Figura 6 -** Média e erro padrão da concentração indireta de óxido nítrico (µM) no soro materno entre os grupos (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022.




[a-b] indicam diferença estatística (p<0,05).

## 6.2 Análises neonatais

Para as análises neonatais, também não houve interação significativa (p<0,05) entre os grupos experimentais e o momento de avaliação para nenhuma das variáveis (tabela 5). Portanto, foram comparadas diferenças entre grupos, independente dos tempos avaliados, e entre os tempos avaliados, independente dos grupos. Ademais, para o teste de regressão linear em função das doses experimentais utilizadas, somente a lactatemia sanguínea apresentou significância estatística (p<0,05).

**Tabela 5** - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Controle vs. 5 mg/kg vs. 10 mg/kg vs. 20 mg/kg) e tempo (0h, 1, 6, 12 e 24h) e sua interação para as variáveis experimentais dos neonatos (p<0,05). São Paulo, 2022.

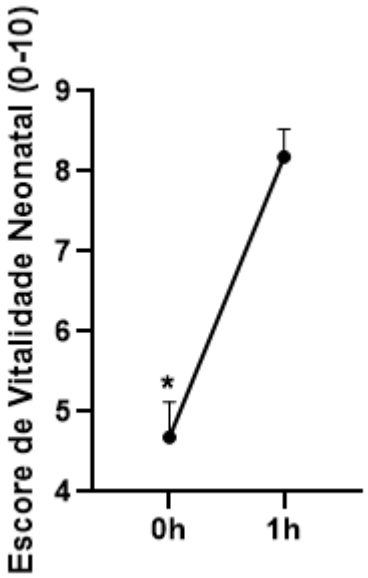
| Variáveis | Tratamento | Tempo | Tempo X Tratamento |
|---|---|---|---|
| Escore de vitalidade neonatal | 0.3923 | <.0001 | 0.7412 |
| Frequência cardíaca | 0.0881 | <.0001 | 0.9993 |
| Frequência respiratória | 0.2553 | 0.0073 | 0.9572 |
| Tônus muscular | 0.3027 | <.0001 | 0.6006 |
| Irritabilidade reflexa | 0.6705 | <.0001 | 0.9445 |
| Coloração de mucosa | 0.8206 | <.0001 | 0.9667 |
| Temperatura corporal | 0.1355 | <.0001 | 0.5416 |
| Saturação periférica de oxigênio | 0.4807 | <.0001 | 0.9791 |
| Lactatemia sanguínea | <.0001 | 0.0031 | 0.7208 |
| Atividade da enzima SOD | 0.0834 | 0.8414 | 0.9603 |
| Atividade da enzima GPx | 0.0337 | 0.0781 | 0.9905 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Concentração de Tióis Totais (GSH) | 0.0718 | 0.7746 | 0.9992 |
| Capacidade antioxidante total (TAC) | 0.4580 | 0.9999 | 1 |
| Grau de peroxidação lipídica (TBARS) | 0.0433 | 0.5027 | 0.9956 |
| Dosagem indireta de óxido nítrico (ON) | 0.0321 | 0.9856 | 0.9887 |
| Oxidação de proteínas | 0.5146 | 0.0691 | 0.8288 |
| Peso corporal | 0.6663 | . | . |

SOD – Superóxido dismutase, GPx – Glutationa Peroxidase, GSH – Glutationa Reduzida, TAC – Capacidade antioxidante total, TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ON – óxido nítrico.

Independente do grupo experimental, os neonatos apresentaram aumento do escore de vitalidade neonatal após 1 hora do nascimento (figura 7).

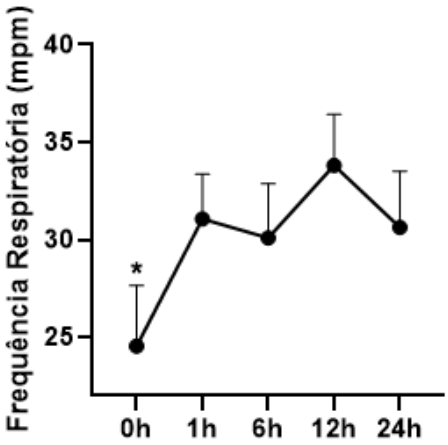
**Figura 7** - Média e erro padrão para o escore de vitalidade neonatal (0-10) ao longo do tempo (0h e 1h). São Paulo, 2022.




* indica diferença estatística (p<0,05).

A frequência respiratória dos neonatos, embora dentro do valor mínimo de referência, foi inferior ao nascimento quando comparado aos demais tempos experimentais, independente do grupo experimental (figura 8).

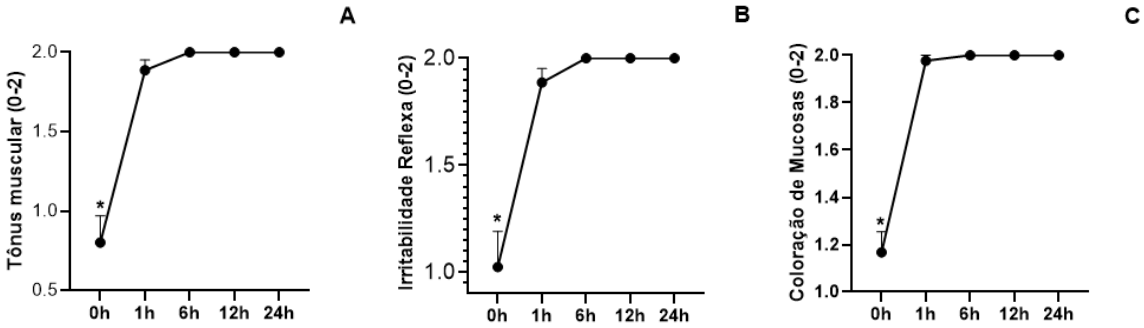
**Figura 8 -** Média e erro padrão para a frequência respiratória (mpm) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022.




* indica diferença estatística (p<0,05).

Da mesma forma, os escores de tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração de mucosa também foram menor ao nascimento em relação aos demais tempos, independente do grupo experimental (figura 9 A, B e C, respectivamente).

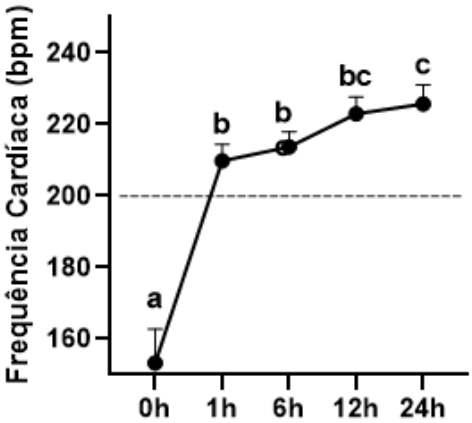
**Figura 9 -** Média e erro padrão para o escore de tônus muscular (0-2) (A), irritabilidade reflexa (0-2) (B) e coloração de mucosa (0-2) (C) ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022.




* indica diferença estatística (p<0,05).

A frequência cardíaca foi inferior ao valor de referência ao nascimento, atingindo estabilização fisiológica a partir da 1 hora pós-nascimento e apresentando valor superior às 24h de vida (figura 10).

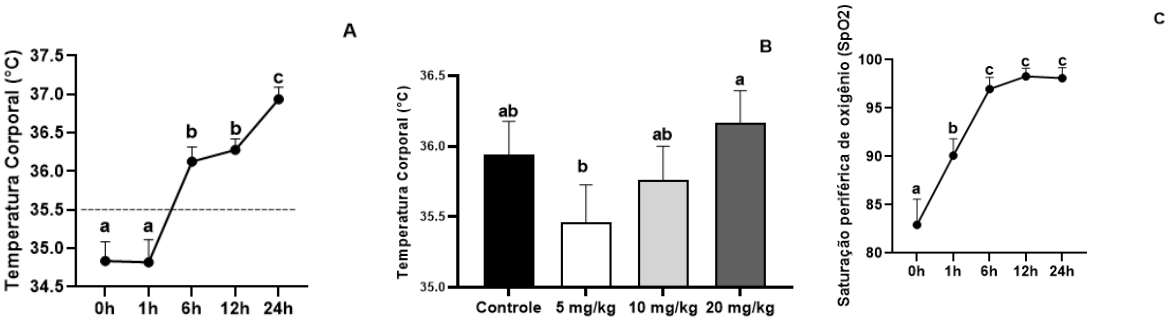
**Figura 10 -** Média e erro padrão para a frequência cardíaca (bpm) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022.




a-c indicam diferença estatística (p<0,05).
- - - Indica o valor mínimo de referência para a frequência cardíaca em neonatos caninos.

A temperatura corporal e a saturação periférica de oxigenação apresentaram comportamento semelhante à frequência cardíaca, sendo inferiores ao valor de referência ao nascimento, entretanto, atingindo estabilização fisiológica a partir das 6h pós-nascimento (figura 11 A e C, respectivamente). Ainda, a temperatura corporal apresentou diferença estatística entre os grupos, independente dos tempos, sendo inferior no Grupo 5 em comparação ao Grupo 20 (figura 11 B).

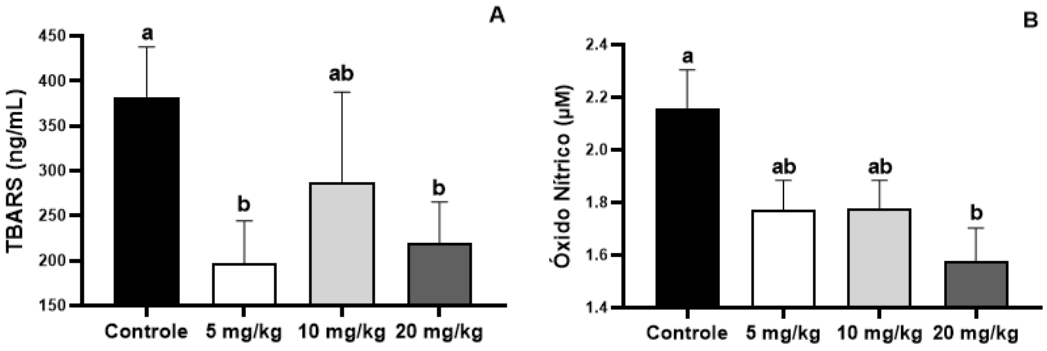
**Figura 11** - Média e erro padrão para temperatura corporal (°C) e saturação de oxigenação periférica (SpO2 %) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h) (A e C, respectivamente), e para a temperatura corporal entre os grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg) (B). São Paulo, 2022.




a-c indicam diferença estatística (p<0,05).
- - - Indica o valor mínimo de referência para a temperatura corporal em neonatos caninos.

A peroxidação lipídica foi superior nos neonatos do Grupo Controle quando comparados aos dos Grupos 5 e 20, porém não diferiu estatisticamente do Grupo 10 (figura 12 A). A concentração indireta de óxido nítrico também foi superior nos neonatos do Grupo Controle em comparação aos do Grupo 20, não diferindo dos demais grupos experimentais (figura 12 B).

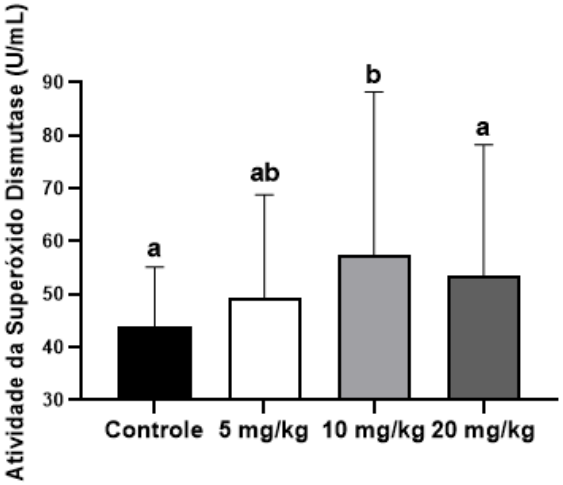
**Figura 12 -** Média e erro padrão para peroxidação lipídica (TBARS; ng/mL) (A) e da concentração indireta de óxido nítrico (NO; µM) (B) dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022.




[a-b] indicam diferença estatística (p<0,05).

A atividade da Superóxido Dismutase foi inferior no Grupo Controle em relação ao Grupo 10, entretanto, não diferiu dos demais grupos (figura 13).

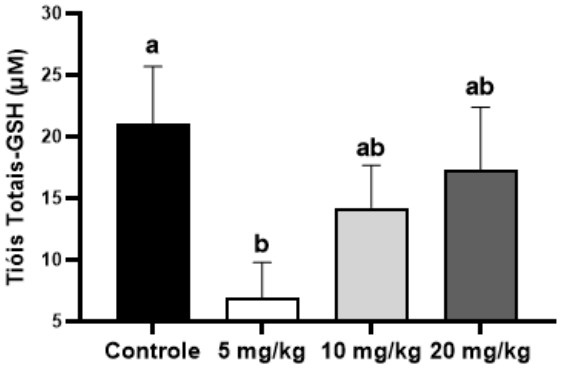
**Figura 13 -** Média e erro padrão da atividade da Superóxido Dismutase (SOD; U/mL) sérica dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022.




[a-b] indicam diferença estatística (p<0,05).

Surpreendentemente, a concentração de tióis totais foi superior no Grupo Controle em comparação ao Grupo 5, e não diferiu estatisticamente dos demais grupos tratados (figura 14).

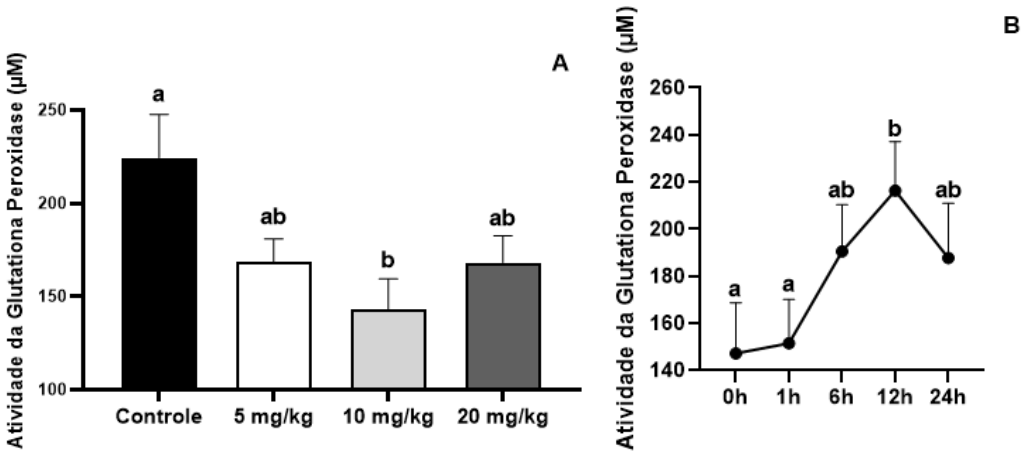
**Figura 14 -** Média e erro padrão para a concentração de tióis totais (GSH; µM) dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg**)**. São Paulo, 2022.




a-b indicam diferença estatística (p<0,05).

De forma semelhante, a atividade da GPx também foi superior no Grupo controle em relação ao Grupo 10, não apresentando diferença estatística dos demais grupos (figura 15 A). Ainda, a atividade sérica da GPx apresentou valores inferiores durante a primeira hora de vida, aumentando sua atividade progressivamente até atingir superioridade estatística às 12 e 24 horas pós-nascimento (figura 15 B)

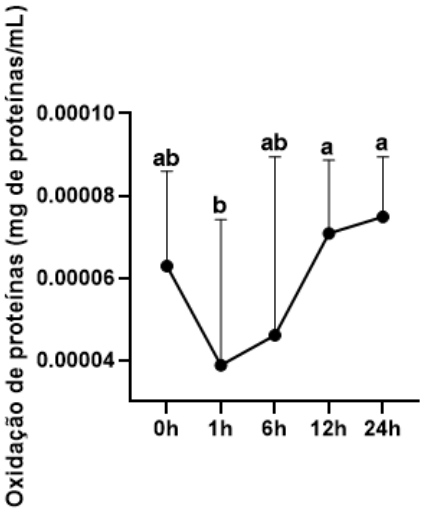
**Figura 15 -** Média e erro padrão da atividade sérica da Glutationa Peroxidase (GPx; U/mL) dos neonatos nos grupos experimentais (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg) (A) e ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h) (B). São Paulo, 2022.




a-b indicam diferença estatística (p<0,05).

Quanto à oxidação de proteínas, os neonatos apresentaram valor inferior com 1 hora de vida em relação às 12 e 24 horas, não diferindo dos demais tempos experimentais, independente dos grupos (figura 16).

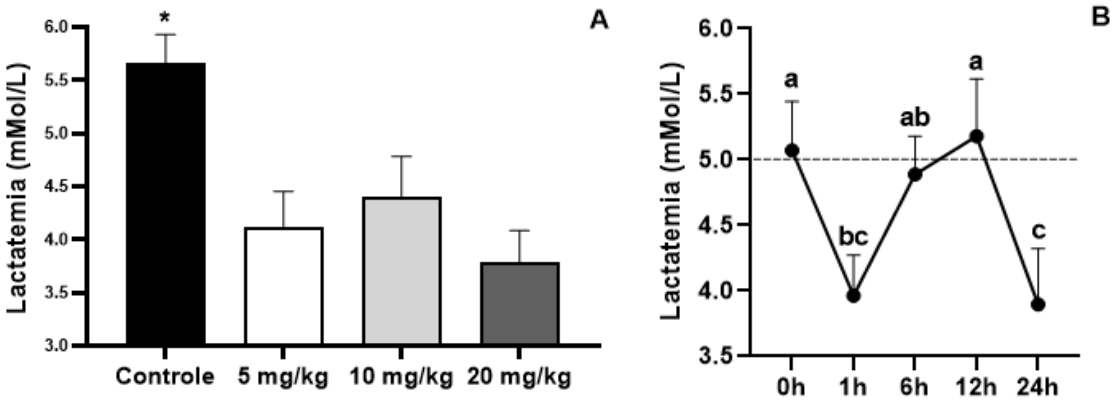
**Figura 16** - Média e erro padrão para oxidação de proteínas (mg de proteínas/mL) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h). São Paulo, 2022.




a-b indicam diferença estatística (p<0,05).

A lactatemia sanguínea dos neonatos foi significantemente maior no Grupo Controle em relação aos grupos tratados (figura 17 A). Ainda, quando considerado somente os tempos de avaliação, a lactatemia foi superior ao nascimento e às 12h pós-nascimento, apresentando valores inferiores somente à 1 e às 24h de vida, independente dos grupos experimentais (figura 17 B).

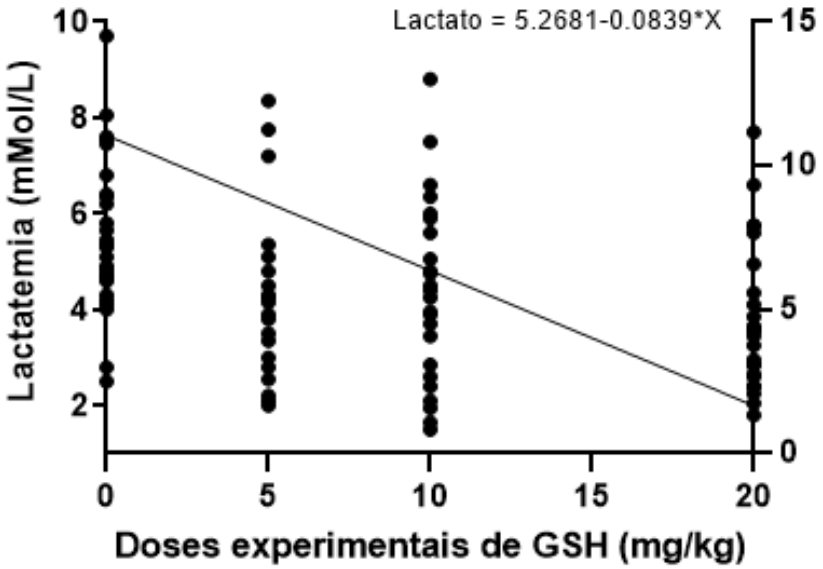
**Figura 17 -** Média e erro padrão para lactatemia sanguínea (mMol/L) dos neonatos ao longo dos tempos experimentais (0h, 1h, 6h, 12h e 24h) e nos Grupos (Controle, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022.



[a-c] indicam diferença estatística entre os tempos (p<0,05).
* indica diferença estatística entre os grupos (p<0,05).
---- indica o valor máximo de lactatemia para um bom prognóstico em neonatos caninos segundo Gropetti et al., 2010.

Ademais, considerando o teste de regressão linear em função das doses experimentais utilizadas, podemos observar que a dose de tratamento ideal para manter valor de lactatemia abaixo de 5 mMol/L, (valor de referência para um melhor prognóstico em neonatos caninos segundo Gropetti et al., 2010), seria de 3,195 mg/kg de peso materno (figura 18).

**Figura 18 -** Regressão linear dos valores de lactatemia (mMol/L) em função das diferentes doses de tratamento com GSH (0, 5, 10 e 20 mg/kg). São Paulo, 2022.



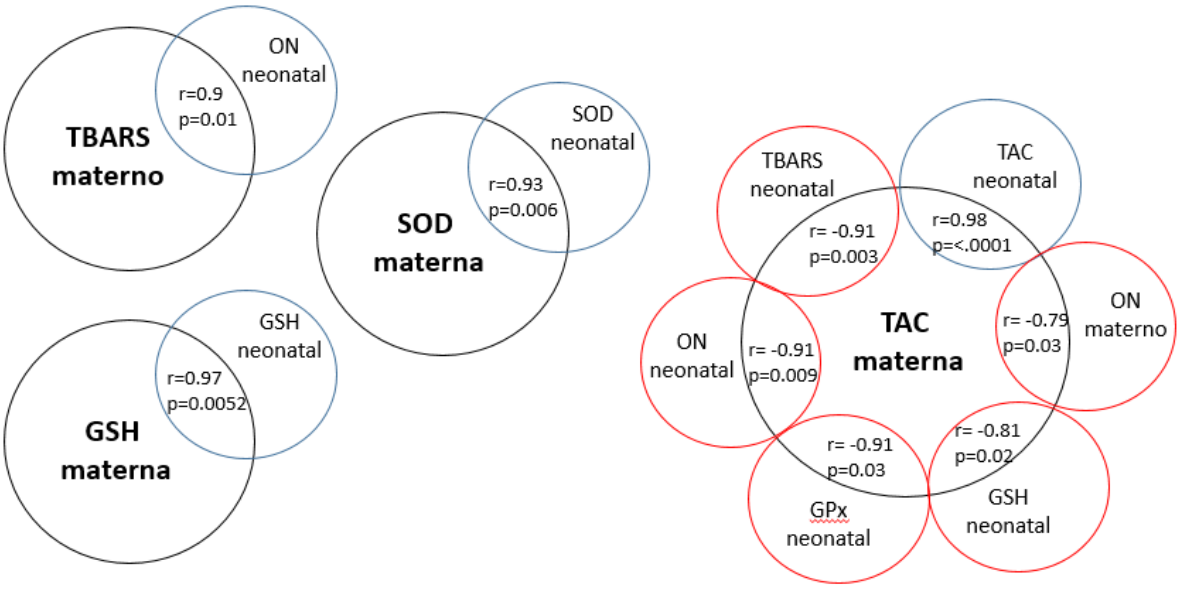

p= 0,0001

## 6.3 Análises de correlação entre as variáveis maternas e neonatais

No Grupo Controle, a peroxidação lipídica materna correlacionou de forma positiva com a concentração indireta de óxido nítrico neonatal; a concentração materna de tióis totais correlacionou positivamente com a concentração neonatal de tióis totais; a atividade materna da superóxido dismutase correlacionou positivamente com a atividade neonatal da superóxido dismutase. Além disso, a capacidade antioxidante total das mães correlacionou positivamente com a capacidade

antioxidante total dos neonatos, e negativamente com a peroxidação lipídica, com a dosagem indireta de óxido nítrico, com a atividade da superóxido dismutase e com a concentração de tióis totais dos neonatos. Ainda, correlacionou de forma negativa com a dosagem indireta de óxido nítrico materno (figura 19)

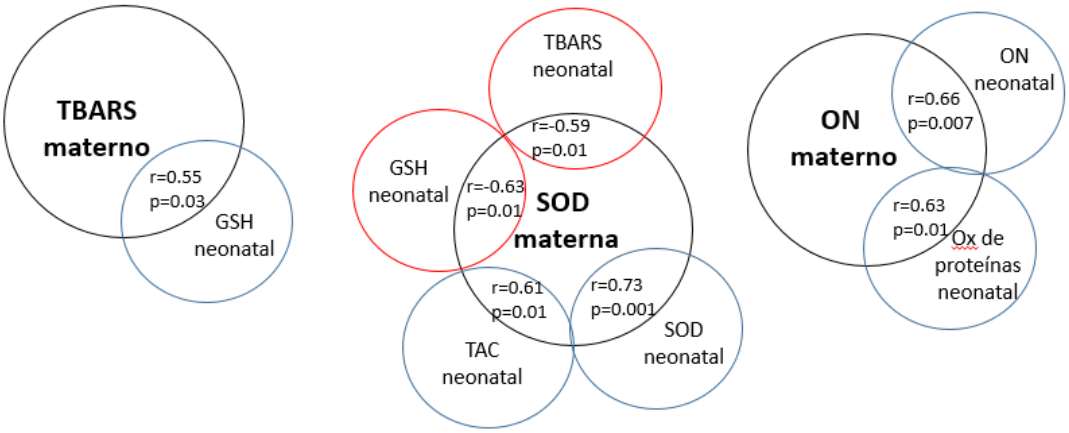
**Figura 19** – Análise de correlação das variáveis maternas e neonatais do Grupo Controle. São Paulo, 2022.




TBARS – peroxidação lipídica, TAC – capacidade antioxidante total, GSH – concentração de tióis totais, SOD – atividade da superóxido dismutase, ON – concentração indireta de óxido nítrico, GPx – atividade da glutationa peroxidase.

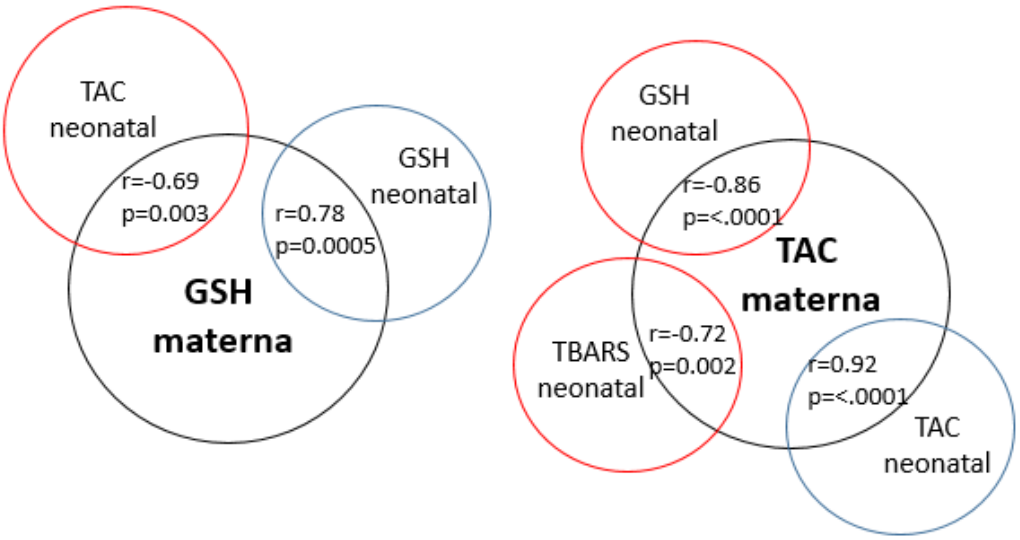
Já nos grupos tratados, podemos observar que a peroxidação lipídica materna correlacionou positivamente com a concentração de tióis totais tanto das mães quanto dos neonatos; a dosagem indireta de óxido nítrico materno correlacionou positivamente com a dosagem indireta de óxido nítrico e com a oxidação proteica neonatal. A atividade materna da superóxido dismutase correlacionou positivamente com a capacidade antioxidante total tanto materna quanto neonatal, e com a atividade neonatal da superóxido dismutase. Ainda, correlacionou negativamente com a peroxidação lipídica e com a concentração de tióis totais dos neonatos (figura 20).

**Figura 20** - Análise de correlação das variáveis maternas e neonatais dos grupos tratados. São Paulo, 2022.




Ademais, a concentração materna de tióis totais correlacionou de forma negativa com a capacidade antioxidante total materna e neonatal; e positivamente com a concentrações de tióis totais dos neonatos. Por fim, a capacidade antioxidante total das mães correlacionou negativamente com a peroxidação lipídica e com a concentração de tióis totais dos neonatos; e positivamente com a capacidade antioxidante total neonatal (figura 21).

**Figura 21 -** Análise de correlação das variáveis maternas e neonatais dos grupos tratados. São Paulo, 2022.




TBARS – peroxidação lipídica, TAC – capacidade antioxidante total, GSH – concentração de tióis totais,

# *Discussão*

# 7 DISCUSSÃO

Estudos acerca do metabolismo redox e da suplementação antioxidante têm sido realizados cada vez mais, dada a importância das ações prejudiciais que o desequilíbrio pelo aumento da produção das EROs pode causar no organismo. A Glutationa Reduzida é o tiól não proteico mais abundante em mamíferos, e o sistema antioxidante dependente de GSH desempenha função central de suma importância na proteção celular contra as lesões oxidativas. Além disso, o equilíbrio entre GSH/GSSG representa um dos mais importantes sistemas de defesa antioxidante nas células pulmonares (Rahman e Macnee, 2000).

O presente estudo objetivou avaliar, de forma inédita na literatura médica e veterinária, o efeito da suplementação pré-natal de Gutationa Reduzida na adaptação pós-natal de neonatos termos nascidos por cesariana eletiva.

## 7.1 Análises maternas

Surpreendentemente, a terapia antioxidante com GSH em diferentes doses não influenciou na concentração de tióis totais (avaliação indireta para a concentração sérica de GSH) entre os grupos avaliados. Embora a ausência de significância estatística para todas as análises séricas dos antioxidantes das fêmeas, de acordo com nossos resultados, as diferentes doses de suplementação com GSH sugerem efeito positivo considerável sobre a peroxidação lipídica das fêmeas dos Grupos 5 e 10, pois, comparadas ao Grupo Controle e ao Grupo 20, apresentaram menor concentração sérica de subproduto de lesão oxidativa. Além disso, todas as fêmeas apresentaram queda dos valores de peroxidação lipídica com 1 hora pós-parto (aproximadamente 3 horas pós administração do tratamento, considerando as médias de tempo da tabela 5).

Sabe-se que a peroxidação lipídica é resultado da ação dos radicais livres, principalmente do radical hidroxila, sobre os ácidos graxos insaturados da membrana

celular, decorrente do desequilíbrio entre a produção das espécies reativas ao oxigênio e das enzimas antioxidantes (Barbosa *et al.*, 2010). O estresse oxidativo ocorre quando há aumento na produção das EROs e redução da concentração ou atividade dos antioxidantes, provocados por diversas situações de desequilíbrio, como o periparto, por exemplo.

O aumento da exposição às EROs nesta situação ocorre desde os pródromos do parto, quando comumente as cadelas apresentam alteração do padrão respiratório para taquipneia, associado ao medo, ansiedade e dor (Johnston *et al*., 2001; Akin et al., 2009; Nagel *et al.*, 2019), aumentando assim o consumo de oxigênio. De fato, todas as cadelas apresentaram maior peroxidação lipídica durante os pródromos, corroborando que a fase preparatória do parto é um desafio oxidativo para a espécie.

Embora as cadelas tenham sido submetidas a cesariana previamente ao início da fase expulsiva do parto, o momento adotado para a realização da cirurgia foi sempre após a queda da progesterona sérica, decorrente das alterações e sinalizações hormonais que iniciam o trabalho de parto, incluindo as prostaglandinas, as quais são consideradas mediadores pró-inflamatórios e potente estimuladores da produção de EROs (Vakilian *et al.*, 2009; Diaz-Castro *et al.*, 2015). Além disso, todo o processo cirúrgico associado a maior oferta de oxigênio junto ao protocolo anestésico, são considerados um fator estressante adicional (Schneider *et al.*, 2015).

Uma forma que o sistema antioxidante possui para debelar a formação dos radicias livres é a metabolização do peróxido de hidrogênio em água pela ação da via enzimática GPx/GSH, considerada eficiente mesmo em baixas concentrações. É importante salientar que o sinergismo da atividade da GPx, selênio, GSH/GSSG, GR e NADPH é essencial para o perfeito funcionamento desta via, e que a disponibilidade limitada de NADPH, por exemplo, pode levar ao aumento da GSSG sensibilizando as células ao dano oxidativo (Spector, 2000).

No presente estudo, as cadelas de todos os grupos receberam o tratamento com GSH de forma intravenosa lenta, sempre antes da indução anestésica, portanto, a queda do grau de peroxidação lipídica 1 hora pós-parto sugere que a suplementação com GSH tenha agido pela via descrita anteriormente, diminuindo assim o efeito deletério do estresse oxidativo no periparto. Ainda, as cadelas tratadas com 5 e

10mg/kg de GSH apresentaram menor grau de peroxidação lipídica quando comparadas às que receberam placebo e 20mg/kg.

O fato de o Grupo 20 ter apresentado maior grau de peroxidação lipídica do que os demais grupos tratados pode estar relacionado com o possível efeito prejudicial da suplementação excessiva de antioxidantes, pois da mesma forma que as EROs, os antioxidantes também precisam estar em equilíbrio no organismo. Seifirad *et al.* (2014) corroboram esta hipótese observando que a suplementação excessiva de antioxidantes como o selênio, beta caroteno, vitaminas A, C e E, foi relacionada com efeitos prejudiciais no organismo, associados à inibição das funções fisiológicas das EROs.

De forma controversa à peroxidação lipídica, a dosagem indireta de óxido nítrico foi menor no Grupo Controle comparado ao Grupo 5, e ambos não diferiram dos demais grupos. Embora o óxido nítrico seja uma espécie reativa ao nitrogênio, sua função no organismo é muito mais fisiológica do que patológica, dada a quantidade de processos biológicos em que está envolvido, especialmente no âmbito vascular. O óxido nítrico está diretamente envolvido com a manutenção do tônus muscular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária e na inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular (Dusse *et al.*, 2003).

Além disso, o óxido nítrico é uma peça importante e eficaz na quebra da cadeia de peroxidação lipídica mediada por radicais livres, pois quando o radical hidroxila reage se transformando em ON, o mesmo fica menos biodisponível para continuar sua cadeia de reação para o peróxido de hidrogênio (Dusse *et al.*, 2003; Humell *et al.*, 2006). De fato, nas fêmeas do Grupo Controle, a capacidade antioxidante total correlacionou de forma negativa com o ON, o que indica que, quanto maior a concentração de antioxidante, menor a concentração de ON e vice-versa corroborando sua participação no equilíbrio da cadeia redox. Além disso, considerando os resultados opostos da peroxidação lipídica e da dosagem indireta de óxido nítrico nos Grupos Controle e 5, é possível inferior que o ON tenha desempenhado o seu papel no bloqueio da cadeia de peroxidação lipídica.

## 7.2 Análises neonatais

### 7.2.1 Análises clínicas

A transição para a vida extrauterina requer rápida adaptação respiratória, anatômica, cardiovascular e metabólica (Lourenço e Machado, 2013). Por tal motivo, observou-se nos neonatos ao nascimento menor escore de irritabilidade reflexa, coloração de mucosa, tônus muscular, frequência cardíaca e vitalidade neonatal, apresentando adaptação extra-uterina satisfatória e consequente melhoria desses parâmetros a partir dos 60 minutos de vida.

Em um estudo prospectivo, Abessolo *et al.* (2009) avaliaram a correlação da atividade antioxidante e do Escore de Apgar em bebês nascidos por cesariana, e concluíram que nenhuma das enzimas antioxidantes avaliadas apresentaram efeito, positivo ou negativo, sobre a vitalidade neonatal. Semelhantemente, nossos resultados sugerem que a suplementação com GSH antenatal também não promove efeito no escore de vitalidade dos neonatos caninos avaliados, bem como em todas as variáveis avaliadas para sua atribuição.

Durante a vida intrauterina, a oxigenação fetal é dependente da circulação placentária. O disparo inicial para a respiração neonatal é decorrente da moderada privação de oxigênio e de estímulos táteis e térmicos após o nascimento (Silva *et al*., 2008). Tais estímulos, em neonatos nascidos por cesariana, são determinados pelo clampeamento do cordão umbilical seguido da massagem de reanimação torácica neonatal (Vannucchi e Abreu, 2017). Embora dentro do valor fisiológico esperado para neonatos caninos, todos os animais apresentaram menor valor de frequência respiratória ao nascimento, estabilizando aos 60 minutos de vida.

O aumento da oxigenação de forma progressiva ocorre, pois, durante as primeiras inspirações, somente parte dos alvéolos é preenchido por ar, além do conteúdo líquido dos pulmões dificultar a eficiência das trocas gasosas nas primeiras horas de vida (Tefera *et al.*, 2020; Abreu, 2018). De fato, a saturação periférica de oxigênio nos neonatos de todos os grupos foi baixa ao nascimento, melhorando

gradativamente e atingindo estabilização fisiológica às 6h de vida. O uso da GSH em humanos foi relatado apresentando correlação positiva com a função pulmonar (Yoon *et al.*, 2012; Khatri *et al.*, 2014), entretanto, não observamos nenhuma influência dos tratamentos sobre os valores de saturação periférica de oxigênio, frequência respiratória, ou ainda no escore de coloração de mucosas.

A dosagem de lactato sanguíneo é considerada um bom indicador da perfusão tecidual, uma vez que é resultado do metabolismo celular anaeróbio. Sendo assim, altas concentrações de lactato sanguíneo indicam utilização de vias secundárias de oxigenação decorrente de eventos hipóxicos, como o nascimento, por exemplo (Koliski *et al.*, 2005; Groppetti *et al.*, 2010). Ao nascimento, neonatos caninos apresentam acidose mista, caracterizada por diminuição do pH sanguíneo, diminuição do excesso de base (do inglês, base *excess*), hipercapnia e hipoxemia, compatível com o metabolismo anaeróbico e consequente produção de ácido lático, decorrente da hipóxia perinatal (Silva *et al.*, 2008). Ademais, a hiperlactatemia (>5 mMol/L; Gropetti et al., 2010) está correlacionada com aumento da morbimortalidade de neonatos caninos durante as 48 horas pós-nascimento (Lourenço e Machado, 2013).

Independentemente dos grupos experimentais, os neonatos apresentaram valores de lactatemia acima da referência ao nascimento e com 12 horas de vida, estando dentro da normalidade fisiológica apenas com 1, 6 e 24 horas de vida. Conforme já mencionado, neonatos nascidos por cesariana apresentam função pulmonar e troca gasosa diminuída devido a diminuição da absorção do fluídos pulmonar (Tefera *et al.*, 2020; Abreu, 2018; Silva *et al.*, 2015). Tais fatos justificam a hiperlactatemia neonatal observada ao nascimento, porém, ao longo do tempo, com melhora na adaptação respiratória, há também melhora na perfusão tecidual.

Entretanto, inesperadamente, a hiperlactatemia foi novamente verificada às 12 horas de vida. Suetrong e Walley (2016) esclarecem que o lactato não é apenas um marcador de anaerobiose, podendo também ser produzido principalmente pela musculatura esquelética, cérebro, intestino e pulmões, em resposta adaptativa a um estado hipermetabólico do organismo. Na espécie canina, sabe-se que o intestino sofre alterações importantes às 12 horas de vida, como o fechamento das microvilosidades intestinais, por exemplo (Chastant e Mila, 2019). Durante este período, estima-se que ocorra também o *clearance* pulmonar e o fechamento do ducto

arterioso. Abreu (2018) relatou que o completo *clearance* pulmonar em neonatos caninos ocorre em até 24 horas de vida. Já o fechamento do ducto arterioso, ocorre em até 48 horas de vida em >90% dos neonatos humanos (Backes *et al.*, 2022), entretanto, tal informação para a espécie canina é ausente em literatura.

Considerando os grupos de suplementação com GSH, os neonatos do Grupo Controle apresentaram valores de lactatemia sanguínea superior a todos os grupos tratados. Nalos et al. (2013, apud Sgorbini *et al.* 2015), relacionaram o aumento de lactato sanguíneo com a indução de produção mitocondrial de espécies reativas ao oxigênio, aumentando, assim, o desequilíbrio oxidativo. Embora sem influência do tratamento nos demais parâmetros de oxigenação e perfusão, podemos inferir que a suplementação com GSH promoveu melhoria na perfusão tecidual dos neonatos tratados. Ainda, de acordo com o teste de regressão linear realizado, sugere-se que a dose ideal de suplementação antenatal de GSH seria de 3,195 mg/kg de peso materno para manter a lactatemia abaixo do valor máximo de referência, sendo assim uma dose intermediária entre o Grupo Controle e o Grupo 5.

Em relação ao sistema circulatório, todos os neonatos apresentaram bradicardia (<200 bpm) ao nascimento, o que também pode ser atribuído à hipoxemia fisiológica decorrente do nascimento. No período neonatal, o reflexo barorreceptor é ausente, sendo a hipóxia ao nascimento e a elevação da pressão arterial suficientes para induzir a bradicardia, pois a circulação neonatal é considerada um sistema de baixa resistência e alto fluxo (Moon *et al.*, 2001; Lourenço e Machado, 2013). Entretanto, a estabilização da frequência cardíaca após 1 hora de vida demonstra adequada adaptação circulatória dos neonatos ao meio extra-uterino.

Outra particularidade fisiológica do período neonatal é a termorregulação ineficiente, devido à imaturidade hipotalâmica para controle de temperatura, ausência do reflexo de tremor e escassa reserva de tecido adiposo subcutâneo. Portanto, o neonato canino depende da temperatura ambiental para adequada termorregulação (Johnston *et al.*, 2001). Almeida *et al.* (2022) relataram que neonatos nascidos por cesariana apresentam hipotermia ao nascimento acompanhada de queda abrupta de temperatura, agravando a hipotermia, 1 hora pós-nascimento, possivelmente relacionado à queda de temperatura materna decorrente do procedimento anestésico e cirúrgico; e a facilidade neonatal de dissipação de calor, dada a maior área de

superfície em relação a massa corporal. Entretanto, após 1 hora de vida, os neonatos normalizam a temperatura corporal, em resposta ao rigoroso controle de temperatura ambiental instituído para todos os animais do experimento. Tais resultados também foram observados neste estudo para os neonatos, independentemente dos grupos experimentais aos quais pertenciam.

Ainda, os neonatos do Grupo 5 apresentaram menor média de temperatura corporal quando comparados aos neonatos do Grupo 20. De acordo com levantamento bibliográfico realizado até o presente momento, não há estudos que comprovem a influência da concentração de antioxidantes na temperatura corporal de neonatos. Entretanto, alguns estudos indicam que a hipotermia como protocolo adicional de tratamento em neonatos pós-anóxia influencia positivamente na concentração de antioxidantes como SOD, GPx e GSH (Zhao e Chen, 2015; Kletkiewicz *et al.*, 2016 A; Kletkiewicz *et al.*, 2016 B). Porém, não há evidências científicas e biológicas de que o inverso também ocorra, ou seja, não é possível sugerir que a concentração de GSH tenha interferido nas diferenças de temperatura.

### 7.2.2 Análise do metabolismo redox

De forma inesperada, a suplementação antenatal com GSH promoveu maior concentração de tióis totais nos neonatos não tratados em relação aos tratados com 5 mg/kg de peso materno, e não diferenciou estatisticamente dos demais tratamentos, assim como a atividade de GPx também foi maior no Grupo Controle quando comparada ao Grupo 10, sem diferença entre os demais grupos. Para este curioso resultado, podemos inferir algumas hipóteses acerca da metabolização, biodisponibilidade e transferência transplacentária de antioxidantes para os fetos. Embora sem diferença estatística para a concentração indireta de GSH e a atividade de GPx entre os grupos na avaliação materna, é possível sugerir que a GSH tenha sido consumida pelas mães mesmo antes de ser entregue aos fetos.

A GSH é o tiol mais abundante, encontrado em concentrações altas (1-10mM) em praticamente todos os mamíferos e células, e o sistema antioxidante dependente de GSH desempenha um papel central na proteção celular contra danos oxidativos, sendo um dos primeiros sistemas antioxidantes a ser consumido nas

reações redox (O'Donovan e Fernandes, 2000). O fato das mães tratadas com 5 e 10 mg/kg de GSH terem apresentado menor grau de peroxidação lipídica, e de todas as fêmeas terem apresentado diminuição da peroxidação lipídica pós administração do tratamento, sugere que a GSH tenha sido consumida para debelar as ações oxidantes do organismo materno, diminuindo ou inviabilizando a transferência materno-fetal.

Ainda, pode-se sugerir que, nas doses utilizadas, a concentração de glutationa não foi suficiente para debelar as reações redox da mãe e ainda assim ter quantidade suficiente para ser transferida via transplacentária. Ademais, sabe-se que o crescimento fetal está diretamente associado ao aumento do metabolismo placentário, resultando em maior produção de EROs e favorecendo o desbalanço oxidativo na fêmea gestante e no tecido placentário (Rizzo *et al.*, 2012), o que justificaria também a possibilidade de consumo placentário da GSH. Todavia, a considerar os valores obtidos entre os grupos para o grau de peroxidação lipídica e para a atividade enzimática da SOD, não é possível excluir totalmente a possibilidade de influência da suplementação antenatal com GSH no metabolismo redox dos neonatos.

Observamos que a enzima GPx aumentou gradativamente a sua atividade ao longo do período experimental, havendo um pico de ação às 12 horas de vida, simultaneamente ao momento que foi constatado maior concentração de oxidação proteica. Tanto a GPx quanto a catalase são enzimas responsáveis pela degradação do peróxido de hidrogênio resultante da ação da SOD. Entretanto, a GPx requer outros substratos para efetivar tal neutralização, como o selênio e o mecanismo GSH/GSSG, por exemplo, diferentemente da catalase que é capaz de agir de forma independente e direta. Portanto, a atividade da GPx pode ser considerada mais lenta e crônica quando comparada à atividade das demais enzimas antioxidantes (Birben *et al.*, 2012). O mesmo padrão temporal da atividade da GPx foi observado em neonatos caninos por Almeida e colaboradores (2022), que apresentaram aumento da atividade ao longo do tempo, ao mesmo passo que a SOD apresentou declínio inversamente proporcional, corroborando que, de fato, a GPx age de forma tardia na tentativa de debelar os efeitos prejudiciais dos radicais livres.

Ao nascimento, os neonatos precisam passar por uma rápida transição anatômica e funcional, especialmente no âmbito respiratório. As primeiras inflações

pulmonares decorrentes do início da respiração neonatal causam uma diminuição rápida da resistência pulmonar, aumentando assim o fluxo sanguíneo neste órgão, alterando a pressão e resultando no fechamento do forame oval. Ainda, com o início da distensão alveolar, a produção enzimática de óxido nítrico é estimulada.

Por sua vez, o óxido nítrico promove vasodilação, apresentando um importante papel na gradativa adaptação dos sistemas cardiovascular e pulmonar do neonato (Mutinati *et al.*, 2014). No presente estudo, foi possível observar maior concentração indireta de óxido nítrico no Grupo Controle em relação ao Grupo 20. Embora a glutationa não tenha ação direta sobre o óxido nítrico na cadeia redox, Siu e colaboradores (2015) também observaram que o tratamento com GSH debelou os efeitos deletérios em lipídios e proteínas relacionados à ação do peroxinitrito produzido pelo óxido nítrico, sugerindo que a sua ação oxidativa, ou ainda a sua concentração, tenha diminuído com o tratamento instituído. Embora o óxido nítrico possa desempenhar um papel deletério devido a produção de peroxinitrito, não podemos deixar de considerar os seus efeitos fisiológicos já citados anteriormente, de extrema importância, principalmente para a transição neonatal.

## 7.3 Correlação do estresse oxidativo e do perfil antioxidante materno e neonatal

Nas análises de correlação, em ambos os tipos de tratamento, os valores da atividade de GPx e a concentração indireta de GSH apresentaram sempre correlações negativas com as demais variáveis antioxidantes, tais como a atividade de SOD e a TAC. Isto é, quanto maior o valor de TAC ou de SOD, menor o valor de GSH ou de GPx. Tal achado pode ser justificado pelo funcionamento da cadeia redox, onde, primeiramente, é necessária a ação da enzima superóxido dismutase na transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, para somente então o sistema GSH/GPx transformar o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água.

Desta forma, é esperado que as concentrações dessas enzimas sejam negativamente correlacionadas. Ademais, Almeida *et al.* (2022) também observaram

esse padrão de comportamento ao longo do tempo entre SOD, GPx e TAC em neonatos caninos.

Tanto o Grupo Controle quanto os grupos tratados apresentaram de média a alta correlação ($r > 0.3$; $p < 0.05$) entre as demais variáveis maternas e neonatais. De forma geral, tais correlações obtidas indicam que quanto maior a atividade antioxidante das mães, maior a atividade antioxidante dos filhotes e menores são as variáveis oxidativas dos mesmos. Tais resultados corroboram com dados anteriormente publicados, onde em humanos e equinos foi relatado importante papel fisiológico protetor da placenta durante a gestação e o parto no combate ao estresse oxidativo fetal, resultando em maior concentração de metabólitos de radicais livres na placenta em relação ao cordão umbilical (Sgorbini *et al.*, 2015). Ademais, Almeida e colaboradores (2022) sugeriram que o mesmo ocorre na espécie canina em neonatos nascidos por cesariana e por parto vaginal.

A placenta permite a transferência materno-fetal de metabólitos, nutrientes e drogas por meio de áreas de transferência especializadas. A transferência de uma substância dependerá da espessura e extensão da barreira placentária, do gradiente de concentração da substância, ou da presença de mecanismos de transmissão ativa (Brolio *et al.*, 2010). Em humanos, já é consolidado que quase qualquer droga ou substância química administrada à mãe tem a capacidade de atravessar a placenta, a menos que seja metabolizada ou alterada antes ou durante a passagem, ou ainda, se o tamanho molecular ou a solubilidade não permitirem a transferência (Eshkoli *et al.*, 2011). A glutationa é uma molécula transportada negativamente em pH fisiológico e é incapaz de se difundir de forma livre através da membrana lipídica celular (Bachhawat e Yadav, 2018), o que implica na necessidade de transportadores de membrana para realizar esta função. Ainda, Oestreicher e Morgan (2019) relatam que a glutationa é transportada através da membrana plasmática por outros aminoácidos ou dipeptídeos, e uma vez transportada para o citoplasma, ocorre sua nova síntese dentro do citosol celular.

Segundo Brólio *et al.* (2010), os aminoácidos são rapidamente transferidos através do transporte ativo, e alguns aminoácidos não essenciais são encontrados em maior concentração placentária do que no plasma materno ou fetal. Considerando que a GSH é um tripepitídeo (ligação de três aminoácidos), presume-se então que haja

transporte transplacentário. Ainda, alguns estudos relatam que a GSH tem a capacidade de ser transportada via transplacentária por mecanismo de potencial de membrana em humanos (Iioka *et al.*, 1987 A; Iioka *et al.*, 1987 B), entretanto, até o momento, não há resultados consolidados em relação à transferência transplacentária de GSH.

Portanto, mais estudos são necessários para determinar uma dose adequada de tratamento. Ainda, novas formas de administração poderiam ser consideradas, objetivando desviar das variáveis maternas de metabolização e transporte, como por exemplo, a instilação traqueal ou intranasal diretamente no neonato.

# *Conclusão*

# 8 CONCLUSÃO

- A suplementação antenatal com GSH não impôs efeito na transição feto-neonatal de cães nascidos por cesariana eletiva.
- A suplementação antenatal com GSH não impôs efeito na concentração de GSH neonatal, entretanto, diminuiu o grau de peroxidação lipídica e a lactatemia sanguínea dos neonatos
- De acordo com os resultados obtidos, não foi possível concluir qual a melhor dose de administração materna de GSH para a melhora da adaptação neonatal.
- Maiores estudos acerca da metabolização materna e do transporte materno-fetal da GSH serão necessários para instituir a melhor via e dose de administração.

# 10 REFERÊNCIAS


ABESSOLO, Felix Ovono et al. Fetal distress: Information provided by lactate levels and antioxidant status, compared with the Apgar score. **Sante (Montrouge, France)**, v. 19, n. 1, p. 15-19, 2009.

ABREU, Renata Azevedo de. Desempenho respiratório na transição feto-neonatal de cães nascidos em eutocia vaginal ou cesariana eletiva. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ABUELO, Ángel et al. Effect of colostrum redox balance on the oxidative status of calves during the first 3 months of life and the relationship with passive immune acquisition. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 295-299, 2014.

ALMEIDA, Leticia Lima et al. Both spontaneous vaginal delivery and elective caesarean section influence neonatal redox status in dogs. **Veterinary Record**, v. 190, n. 5, p. e1082, 2022.

AKIN, Fatma et al. Effects of the anesthesia technique used during cesarean section on maternal-neonatal thiol disulfide homeostasis. **Minerva Anestesiologica**, v. 85, n. 11, p. 1175-1183, 2019.

BACHHAWAT, Anand Kumar; YADAV, Shambhu. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ-glutamyl cycle. **Iubmb Life**, v. 70, n. 7, p. 585-592, 2018.

BACKES CH, Hill KD, SHELTON EL, SLAUGHTER JL, LEWIS TR, WEISZ DE, MAH ML, BHOMBAL S, SMITH CV, MCNAMARA PJ, BENITZ WE, GARG V. Patent Ductus Arteriosus: A Contemporary Perspective for the Pediatric and Adult Cardiac Care Provider. **J Am Heart Assoc**. 2022 Sep 6 -11.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.

BARREIROS, André LBS; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATISTA, M.; MORENO, C.; VILAR, J.; GOLDING, M.; BRITO, C.; SANTANA, M.; ALAMO, D. Neonatal viability evaluation by Apgar score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). Anim Reprod Sci, v. 146, n. 3-4, p. 218-226, 2014.

BERKELHAMER, Sara K.; FARROW, Kathryn N. Developmental regulation of antioxidant enzymes and their impact on neonatal lung disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 13, p. 1837-1848, 2014.

BERKELHAMER, Sara K.; FARROW, Kathryn N. Regulação do desenvolvimento de enzimas antioxidantes e seu impacto na doença pulmonar neonatal. **Antioxidantes & Redox Signaling** , v. 21, n. 13, pág. 1837-1848, 2014.

BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World allergy organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BROLIO, Marina Pandolphi et al. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 222-232, 2010.

BUONOCORE, Giuseppe et al. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. **Pediatric Research**, v. 52, n. 1, p. 46-49, 2002.

CHASTANT S, MILA H. Passive immune transfer in puppies. **Anim Reprod Sci.** 2019 Aug 162-170.

CIOFU, Oana; SMITH, Sherie; LYKKESFELDT, Jens. A systematic Cochrane Review of antioxidant supplementation lung disease for cystic fibrosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 33, p. 28-29, 2019.

DAVIS, Jonathan M. Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease. **Acta Paediatrica**, v. 91, p. 23-25, 2002.

DAVIS, Ryan P.; MYCHALISKA, George B. Neonatal pulmonary physiology. In: **Seminars in pediatric surgery**. WB Saunders, 2013. p. 179-184.

DÍAZ-CASTRO, Javier et al. A new approach to oxidative stress and inflammatory signaling during labour in healthy mothers and neonates. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

ESHKOLI, Tamar et al. Drug transport across the placenta. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 707-714, 2011.

FALSAPERLA, Raffaele et al. Oxidative stress in preterm infants: overview of current evidence and future prospects. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 7, p. 145, 2020.

FINNEMORE, Anna; GROVES, Alan. Physiology of the fetal and transitional circulation. In: **Seminars in fetal and neonatal medicine**. WB Saunders, 2015. p. 210-216.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol, v. 105, n., p. 93-104, 1984.

FRANÇA DE SOUZA, Danilo et al. Oxidative state in equine neonates: Anti-and pro-oxidants. **Equine Veterinary Journal**, v. 53, n. 2, p. 379-384, 2021.

GAÁL, T. et al. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, n. 4, p. 391-396, 2006.

GONZALEZ-CANDIA, Alejandro et al. Antenatal melatonin modulates an enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep. **Redox biology**, v. 22, p. 101128, 2019.

GROPPETTI, D. et al. 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.

HELVE, Otto et al. Pulmonary fluid balance in the human newborn infant. **Neonatology**, v. 95, n. 4, p. 347-352, 2009.

HU, Miao-Lin. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1994. p. 380-385.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUMMEL, Stephen G. et al. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. **Free radical biology and medicine**, v. 40, n. 3, p. 501-506, 2006.

IIOKA, H. et al. Human placental glutathione transport mechanism. **Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v. 39, n. 5, p. 725-730, 1987.

IIOKA, H. et al. The role of glutathione on placental amino acid transport (using microvillous membrane vesicles). **Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v. 39, n. 12, p. 2133-2136, 1987.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: Saunders, 2001

KATZ, C.; BENTUR, L.; ELIAS, N. Clinical implication of lung fluid balance in the perinatal period. J**ournal of perinatology**, v. 31, n. 4, p. 230-235, 2011.

KENSLER, Thomas W.; WAKABAYASHI, Nobunao; BISWAL, Shyam. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 89-116, 2007.

KHATRI, Sumita B. et al. Systemic antioxidants and lung function in asthmatics during high ozone season: a closer look at albumin, glutathione, and associations with lung function. **Clinical and Translational Science**, v. 7, n. 4, p. 314-318, 2014.

KISERUD, Torvid. Physiology of the fetal circulation. In: **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. WB Saunders, 2005. p. 493-503.

KLETKIEWICZ, H. et al. Effects of body temperature on post-anoxic oxidative stress from the perspective of postnatal physiological adaptive processes in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 67, p. 287-99, 2016.

KLETKIEWICZ, Hanna et al. Deferoxamine prevents cerebral glutathione and vitamin E depletions in asphyxiated neonatal rats: role of body temperature. **International Journal of Hyperthermia**, v. 32, n. 2, p. 211-220, 2016.

KOLISKI, Adriana et al. Blood lactate concentration as prognostic marker in critically ill children. **Jornal de pediatria**, v. 81, p. 287-292, 2005.

LEE, Jennifer W.; DAVIS, Jonathan M. Future applications of antioxidants in premature infants. **Current opinion in pediatrics**, v. 23, n. 2, p. 161, 2011.

LEVINE, Rodney L. et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 464-478.

LISTA, Gianluca et al. Neonatal and maternal concentrations of hydroxil radical and total antioxidant system: protective role of placenta against fetal oxidative stress. **Neuroendocrinol. Lett**, v. 31, n. 3, p. 319-324, 2010.

LOURENÇO, M. L. G.; MACHADO, L. H. A. Características do período de transição fetal-neonatal e particularidades fisiológicas do neonato canino. . Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 37, n. 4, p. 3003-3308, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MARSEGLIA, Lucia et al. Antioxidant effect of melatonin in preterm newborns. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

MARTINI, Silvia et al. Free Radicals and Neonatal Brain Injury: From Underlying Pathophysiology to Antioxidant Treatment Perspectives. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 2012, 2021.

MARTINI, Silvia et al. Free radicals and neonatal encephalopathy: mechanisms of injury, biomarkers, and antioxidant treatment perspectives. **Pediatric Research**, v. 87, n. 5, p. 823-833, 2020.

MATTOS, Sandra S. Fisiologia da circulação fetal e diagnóstico das alterações funcionais do coração do feto. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, p. 205-207, 1997.

MOON, Paula F.; MASSAT, Bruno J.; PASCOE, Peter J. Neonatal critical care. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 2, p. 343-367, 2001.

MORTON, Sarah U.; BRODSKY, Dara. Fetal physiology and the transition to extrauterine life. **Clinics in perinatology**, v. 43, n. 3, p. 395-407, 2016.

MUTINATI, M.; PANTALEO, M.; RONCETTI, M.; PICCINNO, M.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. Oxidative stress in neonatology: a review. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 1, p. 7-16, 2014.

NAGEL, Christina; AURICH, Christine; AURICH, Jörg. Stress effects on the regulation of parturition in different domestic animal species. **Animal reproduction science**, v. 207, p. 153-161, 2019.

NICHI, M. et al. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NOGUEIRA, C.; BORGES, F.; RAMALHO, A. Micronutrientes com ação antioxidante em neonatos. . **Revista Paulista de Pediatria**, v. v.28, n. 4, p. 381-386, 2010.

ODETTI, Patrizio et al. Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. **Metabolism**, v. 45, n. 11, p. 1319-1322, 1996.

O'DONOVAN, Donough J.; FERNANDES, Caraciolo J. Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. **Molecular genetics and metabolism**, v. 71, n. 1-2, p. 352-358, 2000.

OESTREICHER, Julian; MORGAN, Bruce. Glutathione: Subcellular distribution and membrane transport. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 270-289, 2019.

PASTORE, Anna et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica chimica acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

POGGI, Chiara; DANI, Carlo. Antioxidant strategies and respiratory disease of the preterm newborn: an update. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

QANUNGO, Suparna; MUKHERJEA, Manju. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 215, n. 1, p. 11-19, 2000.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 16, n. 3, p. 534-554, 2000.

RANADE, Rujuta et al. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of dairy heifer calves from birth to weaning. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 583-587, 2014.

RODRIGUES, F. P. M. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. Jornal de Pediatria, v. 72, n. 2, p., 1998.

SANTOS, Janete Castro dos. Efeitos da aminofilina e do doxapram em recém-nascidos advindos de cesariana eletiva em cadelas anestesiadas com midazolam, propofol e isofluorano. 2005.

SCHENKER, S. et al. Antioxidant transport by the human placenta. Clinical Nutrition, v. 17, n. 4, p. 159-167, 1998.

SCHNEIDER, M. et al. Disposition of cimicoxib in plasma and milk of whelping bitches and in their puppies. BMC Veterinary Research, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2015.

SCHÜNEMANN, Holger J. et al. Oxidative stress and lung function. American Journal of Epidemiology, v. 146, n. 11, p. 939-948, 1997.

SEIFIRAD, Soroush; GHAFFARI, Alireza; AMOLI, Mahsa M. The antioxidants dilemma: are they potentially immunosuppressants and carcinogens?. Frontiers in Physiology, v. 5, p. 245, 2014.

SGORBINI, M. et al. Maternal and neonatal evaluation of derivated reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. Theriogenology, v. 83, n. 1, p. 48-51, 2015.

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, n., p. 165-170, 2008.

SINEX, James E. Pulse oximetry: principles and limitations. **The American journal of emergency medicine**, v. 17, n. 1, p. 59-66, 1999.

SMITH, F. O. Challenges in small animal parturition—Timing elective and emergency cesarian sections. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 348-353, 2007.

SOLEVÅG, A. L.; SCHMÖLZER, G. M.; CHEUNG, P.-Y. Novel interventions to reduce oxidative-stress related brain injury in neonatal asphyxia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 142, p. 113-122, 2019.

SPECTOR, Abraham. Oxidative stress and disease. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 193-201, 2000.

SUN, Jie et al. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276-284, 2003.

TEFERA, Maleda et al. Elective cesarean section on term pregnancies has a high risk for neonatal respiratory morbidity in developed countries: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in pediatrics**, v. 8, p. 286, 2020.

VAKILIAN, Katayun et al. On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 19, n. 2, p. 94-99, 2009.

VANNUCCH, Camila Infantosi; ABREU, Renata Azevedo. Cuidados básicos e intensivos com o neonato canino. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 151-156, 2017.

VERONESI, M. C. Assessment of canine neonatal viability—The Apgar score. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 46-50, 2016.

VLAHOS, R.; BOZINOVSKI, S. Glutathione peroxidase-1 as a novel therapeutic target for COPD

YOON, S. Y. et al. The impact of total antioxidant capacity on pulmonary function in asthma patients. **The International journal of tuberculosis and lung disease**, v. 16, n. 11, p. 1544-1550, 2012.

ZHAO, Hui; CHEN, Yueliang. Effects of mild hypothermia therapy on the levels of glutathione in rabbit blood and cerebrospinal fluid after cardiopulmonary resuscitation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 194, 2015.