

## USO DO TESTE DE CLEMENTS MODIFICADO E DENSIDADE ÓPTICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E ALANTOIDEANO PARA AVALIAÇÃO DA MATURIDADE PULMONAR EM CÃES

Christiane da Silva Barreto<sup>1</sup>  
Nereu Carlos Prestes<sup>1</sup>  
Fabiana Ferreira de Souza<sup>2</sup>  
Roberta Valeriano dos Santos<sup>3</sup>  
Bruna De Vita<sup>4</sup>  
Priscilla Mitie Matayoshi<sup>4</sup>  
Luciana Da Silva Leal<sup>4</sup>

### RESUMO

O feto prematuro não sobrevive à vida extra-uterina devido à imaturidade de órgãos vitais, como os pulmões. O objetivo desse trabalho foi avaliar a maturidade pulmonar pelo teste de Clements modificado e densidade óptica dos fluidos fetais. Foram avaliadas 40 amostras de líquidos amniótico e alantoideano colhidos durante a cesariana de 16 cadelas. Ajustes realizados no teste de Clements permitiram a análise dos líquidos fetais na espécie canina, promovendo resultados confiáveis ( $p < 0,05$ ) para as diluições gradativas (de 0,9mL a 0,6mL) com etanol a 95%. Na densidade óptica (DO) dos líquidos fetais foram encontrados valores médios de  $0,220 \pm 0,190$  para o amniótico e  $0,250 \pm 0,02$  para o alantoideano, sendo indicativo de maturidade pulmonar, visto que são superiores a 0,150, valor proposto na medicina humana como indicativo de maturidade do órgão. Portanto, conclui-se que informações básicas sobre a maturidade e a viabilidade do feto canino podem ser avaliadas pelo teste de Clements modificado e densitometria óptica dos fluidos fetais.

**Palavras-chave:** maturidade, fluidos fetais, canino.

### USE OF CLEMENTS' MODIFIED TEST AND OPTICAL DENSITY IN AMNIOTIC AND ALLANTOID FLUIDS FOR EVALUATION OF PULMONARY MATURITY IN DOGS

### ABSTRACT

The premature fetus cannot survive in the extra uterine life due to immaturity of vital organs like the lungs. The aim of this study was to assess lung maturity by Clements' modified test and optical density of fetal fluids. We obtained 40 samples of amniotic and allantoids fluid of 16 pregnant bitches collected during cesarean section. Adjustments to the Clements's test improved the analysis of fluids in canine's species, promoting reliable results for the dilutions (from 0.9 mL to 0.6 mL) with 95% ethanol. In optical density (OD) of fetal fluids we found  $0.220 \pm 0.190$  for the amniotic fluid and  $0.250 \pm 0.02$  for allantoids. This fact is indicative of lung maturity ( $\geq 0.150$ ) in human medicine. Based on these data it is concluded that basic information about the maturity and viability of canine fetus can be evaluated by Clements' modified test and optical density of fetal fluids.

**Key words:** maturity, fetal fluids, canine.

<sup>1</sup> Professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, [nereu@fmvz.unesp.br](mailto:nereu@fmvz.unesp.br). Suporte financeiro: FAPESP.

<sup>2</sup> Professora da Pós-Graduação em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Universidade de Franca.

<sup>3</sup> Pós-Graduada do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu.

<sup>4</sup> Médica Veterinária Autônoma.

## USO DE LA PRUEBA DE CLEMENTS Y DENSIDADE ÓPTICA DE EL LÍQUIDO AMNIÓTICO Y ALANTOIDEO PARA EVALUACIÓN DE LA MADUREZ PULMONAR EN PERROS

### RESUMEN

El feto prematuro no sobrevive a la vida extra uterina debido a la inmadurez de los órganos vitales como los pulmones. El objetivo de este estudio fue evaluar la madurez pulmonar mediante la prueba modificada de Clements y la densidad óptica de los fluidos fetales. Se obtuvieron 40 muestras de líquido amniótico y alantoideo de 16 perras gestantes colectadas durante la cesárea. Ajustes en el test de Clements favorecieran el análisis del líquido en la especie canina, promoviendo resultados confiables ( $p < 0,05$ ) para las diluciones utilizadas (de 0,9mL a 0,6mL) con etanol a 95%. En la densidad óptica (DO) de los líquidos fetales fue encontrado  $0,220 \pm 0,190$  para el amniótico y  $0,250 \pm 0,02$  para el alantoideo, lo que es indicativo de la madurez pulmonar ( $\geq 0,150$ ) en la medicina humana. Basándose en estos datos se concluye que la información básica acerca de la madurez y viabilidad del feto canino puede ser evaluada mediante las pruebas de Clements modificada y de la densidad óptica de los fluidos fetales.

**Palabras-clave:** madurez, líquidos fetales, canino.

### INTRODUÇÃO

A duração da gestação na cadela é relativamente curta, sendo fundamental que os fetos estejam totalmente maduros para que sobrevivam após o parto. A determinação da maturidade fetal permite estimar a probabilidade de sobrevivência dos filhotes e estabelecer terapias pré-natais que possam aumentar as chances de sua sobrevivência (1).

O crescimento do feto requer elementos orgânicos e inorgânicos que estão em suspensão e em dissolução nos fluidos fetais (2). A análise destes elementos torna possível compreender os processos bioquímicos que envolvem a formação e o metabolismo do conceito (3,4). Além disso, com o avanço das técnicas de diagnóstico intra-uterino, é possível instituir um programa de detecção e prevenção de saúde da mãe e do feto (5).

Para adaptação do neonato à vida extra-uterina é essencial que haja uma quantidade adequada de surfactantes, para revestir os espaços aéreos dos pulmões (6). Essas substâncias são produzidas e estocadas nos pneumócitos tipo II (7). A principal função dos surfactantes é inibir, seletivamente, a entrada de líquidos nos pulmões, pela formação de barreira lipoprotéica na parede dos alvéolos (8), havendo aumento da pressão intra-vascular e estímulo da expiração nos neonatos (9, 10).

Alguns testes são utilizados para averiguar a quantidade de surfactante no líquido amniótico, como o Shake Test ou Teste de Clements e o Tap Test (11-14). Estes testes são considerados simples, rápidos e de baixo custo. A mensuração baseia-se na formação e estabilidade de bolhas, quando se mistura o líquido amniótico, em diferentes diluições, com etanol. Quanto maior a estabilidade das bolhas, maior será a quantidade de surfactantes presentes (12,14).

O teste de densitometria óptica pode ser utilizado na avaliação da maturidade fetal. O aumento das células epiteliais de origem pulmonar, pele e trato digestório, além do início da atividade das glândulas sebáceas no feto são responsáveis pelo aumento da turbidez do líquido amniótico no final da gestação (15). O teste é baseado na determinação da densidade

óptica do líquido amniótico pelo espectrofotômetro colorimétrico, utilizando-se água destilada como controle. Valores superiores a 0,150 indicam maturidade pulmonar em humanos (16).

O teste de Clements em três tubos e a densitometria óptica em espectrofotômetro colorimétrico a 650nm foram indicados como métodos diagnóstico ideais para prever a maturidade fetal em humanos (17).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a maturidade pulmonar fetal, pelo Teste de Clements “modificado” e a densitometria óptica dos líquidos amniótico e alantoideano de cadelas, com intuito de identificar possíveis correlações e estabelecer parâmetros fisiológicos que possam ser úteis na clínica obstétrica de cadelas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 40 amostras de líquidos amniótico e alantoideano durante a cesariana de 16 cadelas no Setor de Obstetrícia de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP. A idade gestacional foi determinada pelos sinais clássicos de início de parto, avaliação ultrassonográfica (Scanner 240 – Pie Medical) e aparência dos fetos. A raça, peso e idade das cadelas não foram considerados visto que a unidade de estudo foram os fetos com os anexos embrionários.

A colheita das amostras durante a cesariana foi realizada com o auxílio de seringas graduadas de 5,0mL acopladas a agulhas descartáveis (40x16mm). Para proceder a identificação dos fluidos, realizou-se dissecação da membrana corioalantoideana e amniótica.

O material em duplicata foi armazenado em tubos plásticos de 1,5ml, previamente identificados. As amostras foram avaliadas no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) da FMVZ (UNESP – Botucatu).

O Teste de Clements “modificado” foi baseado na reação de saponificação dos surfactantes das amostras de líquido amniótico e alantoideano total e nas diluições gradativas (de 0,9mL a 0,6mL) com etanol a 95%, observando a formação de halo de espuma que recebeu valores de 0 – 4 de acordo com a intensidade.

No teste de densitometria óptica (DO) a 650nm, uma alíquota de cada fluido foi centrifugada por 10 minutos a uma velocidade de 2.500 rpm. O sobrenadante foi colocado em cubetas de quartzo e avaliado em espectrofotômetro colorimétrico no comprimento de onda de 650nm. Água destilada foi utilizada como branco na leitura. Quando o valor da DO foi superior a 0.150 o feto foi considerado maturo, seguindo o padrão da medicina humana (17).

Os dados das avaliações foram utilizados para o cálculo de medidas descritivas (média e desvio padrão). Testou-se nos fluidos as variáveis e as interações entre elas, ajustando os modelos hierárquicos onde o efeito das mães e dos fetos foram aleatórios.

As diferenças com probabilidade de significância menor que 5% foram consideradas significativas para o teste-t. As análises foram executadas pelo Proc Mixed, SAS versão 6.12.

## RESULTADOS

Os valores das médias e desvios padrão dos líquidos amniótico (n=40) e alantoideano (n=40) de cadelas (n=16) para Teste de Clements “modificado” (TC) (0,9; 0,8; 0,7; 0,6) e densidade óptica (DO) encontram-se na Tabela 1.

## DISCUSSÃO

A avaliação dos fluidos fetais no momento do parto reflete a sincronia entre a fisiologia materna e do concepto e gera subsídios sobre procedimentos que aumentam a viabilidade neonatal.

A colheita dos fluidos fetais, durante o procedimento da cesariana, exigiu cuidados especiais para permitir a respiração do neonato e impedir perdas significativas do volume devido às lacerações nas membranas fetais. No entanto, o reduzido volume das amostras dificultou as mensurações, sendo o volume médio de 5,0mL.

Tabela 1. Valores (média e desvio padrão) para o Teste de Clements (TC) e a densidade óptica (DO) dos líquidos amniótico e alantoideano (n=40) de cadelas (n=16).

Variáveis	Líquido Amniótico	Líquido Alantoideano
TC 0,9	2,13 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,78 <sup>a</sup>
TC 0,8	1,23 ± 0,95 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,38 <sup>a</sup>
TC 0,7	0,45 ± 0,64 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,16 <sup>a</sup>
TC 0,6	0,13 ± 0,4	0,03 ± 0,16
DO	0,220 ± 0,190	0,250 ± 0,02

<sup>a</sup> indica diferença significativa entre linhas p<0,05

Ao realizar a técnica proposta por Clements não foi observado halo de espuma em nenhum dos tubos. Assim, foi recomendado pelo Laboratório de Líquidos da Faculdade de Medicina (UNESP-Campus de Botucatu) a não diluição das amostras com a solução fisiológica e apenas com etanol a 95%, obtendo-se resultados positivos e confiáveis (Teste de Clements “modificado”). O teste de Clements não propõe avaliação das amostras sem diluição prévia.

Das amostras com diluição TC 0,9; 3 amostras de líquido amniótico e 23 de líquido alantoideano, não apresentaram formação do halo de espuma. A ausência de halo nas 3 amostras de líquido amniótico sugere a contaminação com sangue ou mecônio, os quais impedem a formação de halo (7; 10).

Os valores médios das diluições TC 0,9; TC 0,8 e TC 0,7 apresentaram diferença estatística entre os líquidos fetais pelo teste-t com p<0,05. A análise desta diferença reforçou a idéia da importância dos fluidos fetais sobre a maturidade do concepto, a qual está correlacionada com o tipo de líquido e sua intimidade com o feto.

Os valores da diluição TC 0,9 para o líquido alantoideano podem ser justificados pela contaminação no momento da coleta ou decorrente da interrelação existente entre os dois compartimentos. Nas outras diluições (0,8; 0,7 e 0,6) os resultados para os dois líquidos apresentaram-se dentro da faixa de normalidade, conforme descrito na literatura em humanos (12).

Nas diluições TC 0,8, TC 0,7 e TC 0,6 houve redução gradual da formação do halo no líquido amniótico. Quanto maior a quantidade de surfactante, maior é a formação e estabilidade das bolhas presentes no halo, confirmando a hipótese de que quanto maior a diluição, menor será o halo (11).

No líquido alantoideano a média dos valores das diluições (0,8; 0,7 e 0,6) demonstraram diminuição gradativa, estando de acordo com a literatura para líquidos contendo mecônio (7). A disposição anatômica da vesícula alantoideana condiz com os valores insignificantes encontrados na avaliação de Clements, visto que não é esperada a presença de surfactante neste compartimento (18). A média e o desvio padrão na diluição TC 0,9 (0,65±0,78), possivelmente se deve a proporção do líquido alantoideano:etanol 95%.

Não há relatos na literatura da avaliação do líquido alantoideano na espécie humana, por ser estrutura vestigial (19), o que dificultou a discussão comparativa mais profunda. A presença acidental de líquido amniótico no momento da coleta do líquido alantoideano não deve ser descartada, visto que houve a necessidade do rompimento das membranas para favorecer a respiração do neonato (4).

Os dados da diluição TC 0,9 do líquido amniótico apresentaram correlação positiva com a diluição TC 0,8 ( $r=0,791$ ), a qual apresentou correlação positiva com a diluição TC 0,7 ( $r=0,549$ ) e com a TC 0,6 ( $r=0,326$ ). Adicionalmente, correlação positiva foi observada entre TC 0,7 e a TC 0,6 ( $r=0,571$ ). No líquido alantoideano, o teste de Clements apresentou correlação positiva entre as diluições TC 0,9 e TC 0,8 ( $r=0,582$ ), sendo que TC 0,8 apresentou correlação com as diluições TC 0,7 ( $r=0,348$ ) e TC 0,6 ( $r=0,348$ ). A correlação entre as diluições pode ser justificada pela diferença gradativa na concentração de surfactantes nas amostras.

No líquido amniótico, quatro amostras apresentaram formação de halo de espuma representativo, sendo duas de fetos da mesma mãe. A amostra de um destes fetos apresentou reação para a diluição TC 0,9 no líquido alantoideano, o que pode ser indicativo de falhas de coleta. Foi observado ausência do halo de espuma em três amostras do líquido amniótico, sendo questionável, tendo como base as observações descritas na literatura quanto a presença de resultados intermediários ou negativos (12).

Os resultados do teste de Clements não são tão confiáveis quanto o Tap Test ou a absorvância a DO 650nm. O Tap Test proposto por Socol et al. (13) exclui as diluições do teste de Clements e inclui centrifugação por 20 segundos das amostras. No entanto, os pesquisadores ressaltam a necessidade de outros testes para concluir o diagnóstico de maturidade fetal (17). Os testes para predizer a maturidade pulmonar pela detecção e mensuração qualitativa de surfactantes apresentaram como características marcantes a facilidade de realização e o baixo custo (19,20,21).

Os valores para a densidade óptica dos fluidos fetais foram de  $0,220\pm 0,190$  para o amniótico e de  $0,250\pm 0,08$  para o alantoideano, não sendo observado diferença estatística para o teste-t. Quatorze amostras do líquido amniótico e quatro do alantoideano apresentaram valores inferiores aos recomendados na literatura para o líquido humano. Segundo a literatura, amostras de líquido fetal com valores superiores à 0,150 indicam maturidade pulmonar (17).

Postula-se que o valor limítrofe da densidade óptica para os fluidos fetais da cadela deva ser semelhante ao proposto para humanos. Sugere-se que os valores elevados observados no fluido alantoideano ( $0,250\pm 0,08$ ) ocorreram devido à presença de debris celulares e mecônio (4), bem como em outras espécies (22, 23).

A escassez de estudos dos parâmetros propostos para fluido alantoideano dificultou a interpretação mais precisa dos dados.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados e nas condições deste estudo pode-se concluir que o teste de Clements “modificado” possibilita a análise de fluidos fetais caninos, propiciando resultados confiáveis, onde as diluições (0,9; 0,8 e 0,7) espelham a viabilidade fetal e a maturidade pulmonar. Adicionalmente, é possível afirmar que valores superiores à 0,150 na análise da densidade óptica (DO) dos líquidos fetais de cães são indicativos de maturidade pulmonar.

Protocolo Comissão de Ética FMVZ/UNESP - Botucatu: 30/2002.

**REFERÊNCIAS**

1. Lopate C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*. 2008;70:397-402.
2. Campana SG, Chávez JH, Hass P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39:215-8.
3. Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serous and synovial fluids. In: *American society of clinical pathology*. Chicago: Theid Ed; 1993. p.130-58.
4. Barreto CS. Avaliação bioquímica, citológica e do perfil eletroforético de proteínas no líquido amniótico e alantoideano de cadelas entre 30 a 40 dias da gestação e no momento do parto [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.
5. Gordon ED, Bracero FM, Vargas ML, Díaz OC. Evaluación del programa de diagnóstico prenatal de las malformaciones congénitas por cuantificación de la alfafetoproteína. Camaguey 1985-1998. *Rev Cuba Invest Biomed*. 2003;22:5-10.
6. Díaz RAC, Millo JAM, Domínguez NC. Evaluación del surfacén em el síndrome de dificultad respiratoria del prematuro. *Rev Cuba Pediatr*. 2000;72:287-94.
7. Rebello CM, Proença RSM, Troster EJ, Jobe, AH. Terapia com surfactante pulmonar exógeno: o que é estabelecido e o que necessitamos determinar. *J Pediatr*. 2002;78: 215-26.
8. Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1467:255-70.
9. Curley AE, Halliday HL. The present status of exogenous surfactant for the newborn. *Early Human Dev*. 2001;61:67-83.
10. Freddi NA, Proença Filho JO, Fiori HH. Terapia com surfactante pulmonar exógeno em pediatria. *J Pediatr*. 2003; 79: S205-12.
11. Clements JF, Platzker ACG, Tienrney DF. Assessment of the risk respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1972; 286: 1077-81.
12. Rodriguez-Macias KA. A comparison on three test for determining fetal pulmonary maturity. *Int J Gynecol Obstet*. 1995; 51: 39-42.
13. Socol ML. The Tap test: confirmation of a simple, rapid, inexpensive, and reliable indicator of fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162:218-22.
14. Kuchenbecker WK, Pistorius LR, Pattinson RC. The Tap test an accurate first-kine test for fetal lung maturity testing. *S Afr Med J*. 2002;92:720-3.
15. Ram S, Ram S. Amniotic fluid particles and optical density at term - a case report. *Int J Gynecol Obstet*. 2009;11:1.

16. Nomura RMY, Miyadahira S, Francisco RPV, Okatani D, Zugaib M. Avaliação da maturidade fetal em gestações de alto risco: análise dos resultados de acordo com a idade gestacional. *Rev Assoc Med Bras.* 2001;47:346-51.
17. Martínez V, Jiménez M, Schosinsky K. Comparación de la determinación enzimática de fosfolípidos que contienen colina con tres pruebas para evaluar madurez pulmonar fetal. *Rev Costarric Cienc Med.* 1999;20:51-65.
18. Christiansen IBJ. Gestação. In: Reprodução no cão e gato. São Paulo: Manole; 1988. p.179-97.
19. Moore KL, Persaud TVN. Placenta e membranas fetais. In: Embriologia clínica. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.223-88.
20. Kucuk M. Tap test, shake test and phosphatidylglycerol in the assessment of fetal pulmonary maturity. *Int J Gynecol Obstet.* 1998;60:9-14.
21. Roberts SJ. Gestational period, embryology. In: Roberts SJ. *Veterinary obstetrics and genital diseases.* 2nd ed. Michigan: Edwards Brothers; 1971. p.36-46.
22. Souza HEM, Cardoso EC, Barnabé VH, Vale WG. Alterações bioquímicas dos líquidos fetais de bubalinos com o avanço da gestação. *Rev Bras Reprod Anim.* 1999; 23:178-9.
23. Prestes NC, Challoub MD, Lopes MD, Takahira RK. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. *Small Ruminant Res.* 2001;39:277-81.

**Recebido em: 09/06/2010**

**Aceito em: 25/10/2010**