

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA MATURIDADE FETAL EM CÃES

CHRISTIANNE SILVA BARRETO

BOTUCATU-SP

Julho - 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA MATURIDADE FETAL EM CÃES

CHRISTIANNE SILVA BARRETO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Nereu Carlos Prestes

BOTUCATU-SP

Julho - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E
TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Barreto, Christianne Silva.

Aspectos fisiológicos da maturidade fetal em cães /

Christianne Silva Barreto. – Botucatu: [s.n.], 2006.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão. 2. Reprodução.

CDD 636.70824

Palavras-chave: Cadelas; Líquido amniótico; Líquido
alantoideano; Maturidade

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Noel** e **Núbia Marilda** por ficarem ao meu lado quando decidi ir pra tão longe...e por me dar força para a suportar a saudade infinita...*

*Aos meus irmãos **André Luiz** e **Ana Carolina**, que compreenderam a minha necessidade de crescer...*

*À **Simone Lobo Hotz** uma amiga que se metamorfoseou em irmã e mesmo distante não se esquece de mim...*

Vocês acreditaram que de uma família simples podia surgir uma doutora!

AGRADECIMENTOS

Em especial ao **Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes**, pelo humor peculiar, orientação e paciência durante os seis anos entre mestrado e doutorado. Sem o senhor não teria sido possível, muito obrigada por esta chance, espero não ter decepcionado.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP-** e ao **Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária**, pela oportunidade de dar continuidade à minha formação profissional.

À **CAPES** pela concessão da bolsa com a qual pude me dedicar a pesquisa.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP-** pelo apoio financeiro (auxílio à pesquisa) sem o qual não seria possível realizar este trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza**, amiga e companheira que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos colegas do **Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres**, que compartilharam comigo seus conhecimentos e vivências.

Aos professores, residentes e pós-graduandos do **Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária**, que se tornaram minha família paulista.

Ao **Flávio Paz**, amigo que transformou a república da baiana.

As amigas de festas **Ana Augusta Pagnano, Viviane Helena Chirinéia e Ieda Dalla Pria** que me ajudaram a ver Botucatu de maneira diferente.

A amiga **Karina Alberti** pelo carinho com que moldou momentos especiais.

Ao **Prof. Dr. Andrey Borges Teixeira** pela amizade de longos anos e apoio na técnica de radioimunoensaio.

Ao **Laboratório de Líquidos** do Setor de Laboratórios Clínicos da Faculdade de Medicina da UNESP pelas orientações nas avaliações laboratoriais.

Aos funcionários do **Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária**, Walter, Cris, Edílson, Tico, Miguel, Márcio e Marcos, pela animação do dia-a-dia.

Ao **Prof. M. Sc. Maurício Santana Lordêlo**, do Departamento de Bioestatística da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, pela colaboração.

Aos amigos do **Serviço de Anestesiologia** pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

Aos meus amigos de longas conversas noite à dentro regadas a muita risada, sem vocês não teria a menor graça...como fui feliz!

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar mais um sonho.

*Em especial a **FIFI**, a cadelinha mais carinhosa que já conheci e que compreendia quando tinha acabado o amor!!!!*

SUMÁRIO

	PÁGINA
Lista de Figura.....	07
Lista de Tabelas.....	08
1- INTRODUÇÃO.....	11
2- OBJETIVOS.....	14
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	16
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1- Grupo Experimental.....	34
4.2- Colheita do Material.....	34
4.3- Assistência Pós-operatório.....	35
4.4- Determinação de surfactantes fetais.....	35
4.5- Determinação de proteínas totais, proteínas de baixa massa molecular e da proteína de 66 kDa de massa molecular.....	36
4.6- Dosagem de Cortisol.....	38
4.7- Análise Estatística.....	39
5- RESULTADOS.....	40
6- DISCUSSÃO.....	46
7- CONCLUSÕES.....	58
8- BIBLIOGRAFIAS.....	60
9- ANEXO.....	68

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 – SDS-PAGE das amostras de líquido amniótico (A) e alantoideano (B) de cadelas gestantes (n=16). A massa das bandas protéicas está expressa em kDa. Padrão de massa molecular (M. P. M.) 45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Diluições para o Teste de Clements modificado para a avaliação de surfactantes em líquido amniótico e alantoideano de fetos caninos.....	36
TABELA 2- Valores (média e desvio padrão) para o Teste de Clements (TC), Citologia, Densidade Óptica (DO), Proteínas Totais (PT) e Cortisol presentes no líquido amniótico e alantoideano (n=40) de cadelas gestantes (n=16).....	41
TABELA 3- Valores médios (valores mínimos e máximos) da Densidade Óptica Integrada (I.O.D.) da banda protéica de massa de 66 kDa presente no líquido amniótico (n=35) e alantoideano (n=27) de cadelas gestantes (n=16).....	42
TABELA 4- Média da Densidade Óptica Integrada (I.O.D.) das bandas protéicas (kDa) observadas no gel de separação (12%) presentes no líquido amniótico e alantoideano (n=40) de cadelas gestantes.....	43

BARRETO, C. S. **Aspectos fisiológicos da maturidade fetal em cães.** Botucatu. 2006.76p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

RESUMO

O feto prematuro não sobrevive à vida extra-uterina devido a imaturidade de órgãos vitais como os pulmões e rins. O objetivo desse trabalho foi avaliar a maturidade renal através da identificação de proteínas de baixa massa molecular; pulmonar através da citologia com azul de Nilo (0,1%), teste de Clements modificado e densidade óptica dos fluidos; alfa-fetoproteína através da eletroforese em SDS-PAGE (12%) e concentração de cortisol nos líquidos fetais por radioimunoensaio. Foram obtidas 40 amostras de líquido amniótico e alantoideano de 16 cadelas gestantes pela cesariana. Ajustes no teste de Clements favorecem a análise de fluidos caninos promovendo resultados confiáveis ($p < 0,05$) para as diluições. Células morfologicamente diferentes e com porcentagem de células orangeofílicas e cianofílicas refletem a maturidade pulmonar sugerindo feto em estágio de pós-maturidade. Na densidade óptica (DO) dos líquidos fetais encontramos $220 \pm 0,190$ para os líquidos amniótico e $0,250 \pm 0,02$ para o alantoideano sendo indicativo de maturidade ($\geq 0,150$). A concentração proteica nos fluidos estudados reflete a fisiologia fetal ($p < 0,05$). A dosagem de cortisol indica a exposição do feto no ambiente uterino ($p < 0,05$). A IOD da banda protéica de 66kDa foi de 15,94 para o líquido amniótico e 13,3 para o alantoideano. Cinco bandas proteicas presentes nos dois fluidos podem espelhar a maturidade renal (32; 30; 28; 20 e 12). Com base nestes dados conclui-se que a obtenção de informações básicas sobre a maturidade e viabilidade do feto canino podem ser avaliada com os testes propostos.

Palavras-chave: maturidade, fluidos fetais, canino.

BARRETO, C. S. **Physiological aspects of fetal maturation of dogs.**
Botucatu. 2006.76p. Thesis (PhD in Veterinary Medicine, Animal
Reproduction) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,
Campus Botucatu, University of State of São Paulo UNESP.

ABSTRACT

The premature fetus is unable to survive in extra-uterine environment due to immaturity of its vital organs as the lungs and kidneys. The objective of this work was to evaluate the renal maturity through the identification of low molecular mass proteins; pulmonary maturity through the cytology with Nile blue (0,1%), modified Clements test and optic density of fluids; moreover, the alpha-fetoprotein was evaluated through electrophoresis using SDS-PAGE (12%); and the cortisol concentration from fetal liquids was determined by radioimmunoassay. Forty amniotic and allantoic liquid samples from 16 pregnant bitches were collected by puncture during cesarean section. The Clements test was adapted to canine fluid analysis to promote true results ($p < 0,05$) for the dilutions. Cells morphologically and with percentage of different orangeo and cyanophilia cells reflect the maturity. The optic density (DO) of the fetal fluids liquids were $220 \pm 0,190$ and $0,250 \pm 0,02$ to the amniotic and allantoic liquid, respectively, indicating maturity ($\geq 0,150$). The protein concentrations reflect the fetal physiology ($p < 0,05$) in evaluated fluids. The cortisol concentration indicates the fetal exposition in the uterine environment ($p < 0,05$). The IOD of 66 kDa protein band was 15,94 to amniotic and 13,30 to allantoic liquid. Five protein band in two fluids can reflect the renal maturity (32; 30; 28; 20 e 12). Based in these results we conclude that the tests considered in the study can evaluate the maturity and viability of canine fetus.

Keywords: maturity, fetal fluids, canine.



Introdução

1- INTRODUÇÃO

O conteúdo do útero gravídico é um conjunto singular que instiga a curiosidade devido à organização e complexidade dos seus componentes. A avaliação dos fluidos fetais que envolvem o concepto têm sido alvo de estudos há décadas. Nos animais domésticos, de uma forma geral, poucos ensaios têm sido realizados a respeito da composição dos fluidos fetais e de sua relação com a viabilidade e maturidade do concepto. Um dos fatores limitantes é a disposição anatômica das vesículas amniótica e alantoideana que dificulta uma abordagem mais precisa durante a gestação (CHRISTIANSEN, 1988). Na obstetrícia humana esta limitação não ocorre o que favorece o uso da técnica reduzindo o risco para a mãe e para o feto durante a amniocentese (MOORE & PERSAUD, 1998).

Na literatura, ao se pesquisar sobre a composição dos fluidos fetais dos carnívoros domésticos, observa-se uma grande escassez de trabalhos. CHRISTIANSEN (1988) afirmou que aos 21 dias da gestação, em cadelas, as membranas fetais ocupadas por fluido, formam tumefações ovóides separadas. Aos 35 dias, as membranas, os fluidos e o concepto cresceram tanto que o útero tem diâmetro uniforme em toda a sua extensão.

O crescimento do feto requer elementos orgânicos e inorgânicos que estão em suspensão e em dissolução nos fluidos fetais (CAMPANA et al., 2003). A análise destes elementos torna possível compreender todo o processo bioquímico que envolve a formação e o metabolismo do concepto (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993; BARRETO, 2002).

Na obstetrícia humana muito se questionou sobre a finalidade dos envoltórios fetais promovendo-se investigações científicas, capazes de descobertas que possibilitaram o diagnóstico e tratamento precoce de inúmeras patologias ainda intra-útero. Na medicina veterinária a avaliação dos fluidos fetais vem sendo estudada nas espécies bovina (LINDQVIST & AKERSTROM, 1996), caprina (AIDASANI et al., 1992), ovina (PRESTES et al., 2001; NITSOS et al., 2002), bufalina (SOUZA et al., 1999) e canina

(BARRETO, 2002; VERONESI et al., 2002; OLSON et al., 2003) fornecendo informações sobre a fisiologia da gestação.

O âmnio é formado entre 13 e 16 dias após a concepção em ovelhas e vacas, apresentando-se como um saco de camada dupla repleto de líquido e em íntimo contato com o feto (ROBERTS, 1971). A disposição do âmnio com sua face interna em contato com o feto e, externamente, com o alantocório, permite uma troca de metabólitos, impede aderências entre a pele fetal e a membrana amniótica e favorece a passagem do produto pela cérvix, durante o parto (HAFEZ, 1995; PERRY, 1981). O líquido presente nesta vesícula provém dos organismos materno e fetal em proporções variáveis de acordo com a idade gestacional (CAMPANA et al., 2003). Segundo ROBERTS (1971) a membrana corioalantóideana é a responsável pela comunicação materno-fetal, formando uma vesícula com várias funções, como armazenar o líquido alantoideano.

Quando o tecido fetal entra em contato ou se fixa no endométrio para realizar suas trocas fisiológicas, ocorre a formação da placenta e dos envoltórios fetais (PERRY, 1981), compreendendo o âmnio, saco vitelínico, alantocório e alantóide. Embora a composição exata do líquido amniótico humano e sua dinâmica não estejam totalmente claras, alterações bioquímicas são reconhecidas e associadas com a maturidade fetal e suas disfunções (ÇAGDAS et al., 2000). Este conceito pode ser aplicado ao líquido alantoideano para os animais estudados (BARRETO, 2002).

Com o aperfeiçoamento das técnicas que visam reduzir as taxas de morbidade e mortalidade neonatal humana muito se tem pesquisado no intuito de detectar marcadores da maturidade fetal (NOMURA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003). Estes facilitariam o diagnóstico precoce de alterações que seriam incompatíveis com a vida ou que poderiam resultar em morte no primeiro ano de vida. Levando em consideração o tempo gestacional na cadela (\pm 60 dias) um estudo mais aprofundado sobre a fisiologia da maturidade fetal canina, é de grande auxílio na compreensão dos mecanismos de sobrevivência do concepto.



Objetivos

2- Objetivos

Objetivos Gerais

- compreender a fisiologia gestacional da cadela tendo como foco a maturidade do feto.

Objetivos Específicos

- ❖ avaliar a maturidade pulmonar pela mensuração de surfactantes pulmonares com três técnicas diferentes;
- ❖ avaliar a maturidade renal através da detecção de proteínas de massa molecular inferior a 40 kDa nos fluidos fetais;
- ❖ avaliar a densitometria média da proteína de 66kDa de massa molecular (alfa-fetoproteína);
- ❖ verificar os níveis de cortisol nos fluidos fetais;
- ❖ identificar as possíveis correlações entre as variáveis estudadas;
- ❖ estabelecer parâmetros fisiológicos que possam servir de ferramentas na clínica obstétrica.



Revisão de Literatura

3- REVISÃO DE LITERATURA

Os anexos fetais apresentam características macroscópicas e microscópicas peculiares, portanto os exames minuciosos de seus constituintes fisiológicos são de suma importância para o diagnóstico precoce de alterações durante a prenhez (BELFORT & ORLANDI, 1983; HAFEZ, 1995).

A riqueza de informações sobre o conceito oriunda de estudos sobre os fluidos fetais, como o seu movimento e crescimento, a manutenção da temperatura corpórea, e a participação na bioquímica hemeostática (BELFORT & ORLANDI, 1983). No entanto a circulação fetal e o processo de formação dos líquidos fetais ainda guardam segredos, porém sabe-se que é deste ambiente que o conceito retira água e outros nutrientes e deposita excreta (BELFORT & ORLANDI, 1983; KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). Com o avanço das técnicas de diagnóstico intra-utero, é possível criar um programa de detecção e prevenção voltada a saúde da mãe e do feto (GORDON et al., 2003).

Segundo BELFORT & ORLANDI (1983) o feto humano para reabsorver líquido amniótico utilizaria várias rotas, entre elas a pulmonar. ROBERTS (1971) não admite esta hipótese para o feto animal, pois acredita que não há aspiração de fluido para dentro do pulmão, sendo rebatido por (HAFEZ, 1995) que preconiza a entrada de fluido para o pulmão pela aspiração. De acordo com ROBERTS (1971) a placenta, a deglutição e a própria formação de água pelo metabolismo fetal são as fontes de entrada de fluido para o conceito. Para LUMBERS et al. (1985) o feto não elimina material do conteúdo intestinal, afirmando que a única fonte de fluido seria a excreção urinária e o líquido pulmonar.

Um dos principais componentes do líquido pulmonar constitui-se dos surfactantes. São substâncias produzidas e estocadas nos pneumócitos II (REBELLO et al., 2002), que tem como principal função inibir, seletivamente, a entrada de líquidos para o pulmão, após o nascimento, formando uma barreira lipoprotéica na parede dos alvéolos (VELDHUIZEN & HAASGSMAB, 2000); isto aumentaria a pressão intra-alveolar e assim evitaria o colapamento

estimulando a expiração do neonato (CURLEY & HALLIDAY, 2001; FREDDI et al., 2003).

Pesquisadores afirmaram que os prematuros com deficiência de surfactante tem uma tendência ao colapamento alveolar, com redução da capacidade residual funcional (RODRIGUEZ-MACIAS, 1995; REBELLO et al.; 2002). DÍAZ et al. (2000a) afirmaram que quantidades adequadas de surfactantes para revestir os espaços aéreos nos pulmões é um pré-requisito para a adaptação do neonato a vida extra-uterina. Segundo KOTERBA & PARDIS (1990) a secreção dos surfactantes pode ser estimulada por vários agentes fisiológicos e farmacológicos.

A produção de surfactantes (90% lipídeos, 10% surfactante-proteínas) aumenta com o decorrer da gestação e na dependência do sexo do feto. A partir da 20^a semana o feto humano começa a produzir os surfactantes, porém só atinge níveis adequados no fim do período fetal (MOORE & PERSAUD, 1998). De acordo com REBELLO et al., (2002) a composição química do surfactante pulmonar é bastante semelhante entre as várias espécies animais. Para NOMURA et al., (2001) a produção inadequada de surfactantes constitui a complicação de maior gravidade para a sobrevivência do concepto.

Desde 1959 se estuda a síndrome do desconforto respiratório ou doença da membrana hialina que é a denominação da alteração na produção de surfactante (FREDDI et al., 2003). A partir da década de 80 pesquisadores estudaram surfactantes de várias origens (humano, suíno, bovino e sintético) e isto promoveu a disponibilização dos surfactantes para uso clínico na rotina médica humana (REBELLO et al., 2002).

Outros componentes do líquido amniótico de importância clínica são as células epiteliais alveolares fetais, que são altamente correlacionadas com a maturidade pulmonar fetal. Doenças como a diabetes pode retardar a maturidade pulmonar em humanos, sendo indicado à realização da avaliação celular no final da gestação utilizando a técnica de amniocentese (CAMPANA et al., 2003).

Das intervenções estudadas para se induzir a maturidade pulmonar em fetos prematuros, administração de corticóides na mulher é a que mais tem estimulado os pesquisadores (DÍAZ et al., 2000b). Estudo realizado por REBELLO et al. (2002) com a administração pré-natal de corticosteróides em mulheres gestantes resultou em maior concentração e menor inativação de surfactante pulmonar. Para DÍAZ et al. (2000a) a resposta do pulmão fetal à administração de corticosteróides é variável e o impacto a outros sistemas pode contribuir para um menor resultado clínico. Estes mesmo autores compararam o uso pré-natal de corticosteróides e a eficiência da utilização de surfactante pós-natal, não encontrando relação que indicasse o uso pré-natal de corticosteróides.

Segundo DÍAZ et al. (2000b) o uso de corticosteróides melhora a função cardiovascular e renal, o que seria benéfico para bebês prematuros, também atuaria nos pulmões aumentando a área de superfície de intercâmbio gasoso. BALLABH et al. (2002) observaram que os resultados sobre o uso desta terapia são controversos, porém estes autores acreditam que houve utilização de subdosagem nos casos de gestações gemelares, e que este fator resultou em alterações nos resultados prejudicando a teoria que indica o uso destas terapêuticas.

VERONESI et al. (2002) avaliaram o cortisol plasmático de cinco cadelas gestantes, sete dias antes do início do trabalho de parto até 36 horas depois. Não foi observado aumento significativo até 24 horas ($45,0 \pm 13,0$ nmol/L) antes do início do trabalho de parto; porém no momento considerado momento zero (parto) os valores alcançaram uma média de $90,4 \pm 41,9$ nmol/L, chegando a $51,7 \pm 21,5$ nmol/L 36 horas após o início do parto. Para estes autores a elevação dos níveis do cortisol materno se deve a um aumento da secreção do cortisol fetal envolvendo a maturação do eixo hipofisário-adrenal.

OLSSON et al. (2003) avaliando o cortisol plasmático de cadelas durante a gestação e no momento do trabalho de parto, observaram que houve aumento de 49 ± 9 nmol/L⁻¹ no final da gestação para 242 ± 35 nmol/L⁻¹ ao nascimento do primeiro filhote, permanecendo alto até o nascimento do terceiro filhote depois declinando até o nascimento do último filhote. Metabólitos da

PGF2 α ($0,2\pm 0,0\text{nmol/L}^{-1}$ e $66\pm 17\text{nmol/L}^{-1}$), ocitocina ($63\pm 5\text{pmol/L}^{-1}$ e $166\pm 19\text{pmol/L}^{-1}$) e vasopressina ($2\pm 0\text{pmol/L}^{-1}$ e $26\pm 11\text{pmol/L}^{-1}$) apresentaram a mesma evolução, porém só a vasopressina foi altamente correlacionada com o cortisol.

MOSS et al. (2003a) compararam os resultados da administração de corticosteróides intra-amniótico e intramuscular na maturidade pulmonar de fetos ovinos. A administração intra-amniótica melhorou a função pulmonar, mas houve aumento das taxas de morbidade e mortalidade e retardo no crescimento não sendo indicado, portanto o uso na rotina clínica.

MOSS e colaboradores (2003b) pesquisaram a farmacocinética da betametazona na circulação materna e fetal após a administração intramuscular nas ovelhas e nos fetos através de catéter. Observaram aumento da maturidade pulmonar sem o efeito colateral de retardo no crescimento quando da administração diretamente no feto. A administração intramuscular da betametazona na ovelha promoveu uma concentração fetal baixa, porém por um longo período poderia causar retardo no crescimento fetal.

DERUELLE et al. (2003) avaliando o efeito da administração pré-natal de glicocorticóides (dexametazona) em ovelhas na reação vascular pulmonar dos fetos observaram que a administração prévia muda a resposta do sistema vascular pulmonar as catecolaminas, e o grande benefício seria a melhor adaptação cardíaca ao nascimento. CHAPPUIS (1998) ressalta que os corticóides atuam também acelerando a maturidade das vilosidades intestinais, o que reduziria a absorção de imunoglobulinas presentes no colostro canino.

NITSOS et al. (2002) ao observarem o efeito da administração intra-amniótica de endotoxinas bacterianas em fetos de ovinos, perceberam que o cortisol elevou-se quatro horas após administração com pico máximo em 24 horas ($7,2\pm 1,0\text{ng/mL}$), e retorno aos níveis normais dois dias após a administração. A endotoxina causou alteração transitória na fisiologia fetal, e leve alteração dos níveis de cortisol porém não foi considerada suficiente para estimular a maturidade pulmonar precoce. Os níveis do cortisol materno não sofreram alterações durante o experimento ($8,94\pm 1,18\text{ng/mL}$). NEWNHAM et

al. (2002) ao estudarem a resposta pulmonar frente a administração de endotoxinas no líquido amniótico de ovelhas gestantes (125 dias) concluíram que a resposta pulmonar é mediada por fatores locais e não por resposta do sistema inflamatório, além disto reforçaram a idéia de NITSOS et al. (2002) para quem as alterações no equilíbrio pulmonar não são suficientes para promover maturidade alveolar precoce.

PIAZZE et al. (1998) testaram a maturidade pulmonar fetal em mulheres gestantes (n=68) hipertensas avaliando concomitantemente o efeito da terapia com betametazona. A administração de betametazona acelerou o processo de maturidade pulmonar, em especial nas gestantes entre 24 e 33 semanas sendo facilmente observado nos teste realizados no líquido amniótico.

JOBE em 1983, afirmava que os corticosteróides aceleravam a maturação das células epiteliais do pulmão fetal através do aumento da síntese de fosfolipídeos. Em 2001 este mesmo autor afirmou que sua maior preocupação com a exposição fetal ou neonatal a glicocorticóides antes ou após o estágio de alveolização seria com a perturbação do sutil desenvolvimento alveolar e vascular.

ISOHAMA & ROONEY (2001) avaliando o pulmão de ratos prematuros submetidos a terapia com glicocorticóides observaram que a dexametasona aumentou de 2 a 3 vezes a secreção de surfactante pulmonar. Estes autores afirmaram que os pneumócitos tipo II contém receptores de glicocorticóides e que por isto devem ter papel importante no final de gestação ou no período pós-nascimento, já que estas células são as responsáveis pela produção de surfactantes.

As técnicas mais adotadas para se avaliar a maturidade pulmonar de fetos humanos são a relação lecitina/esfingomiélinina realizada em cromatografia de capa fina, teste de Clements, determinação da absorvância do líquido amniótico a 650nm, contagem de corpos lamelares, método de imunoaglutinação, enzimático e citologia do líquido amniótico (DALENCE et al., 1995; MARTÍNEZ et al., 1999).

A contagem de corpos lamelares compreende a contagem de corpúsculos contendo surfactante endógeno em analisadores de células sanguíneas; os resultados das pesquisas indicam resultados promissores (FREDDI et al., 2003). Para DALENCE e colaboradores (1995) quando comparado com a relação lecitina/esfingomielina, a contagem de corpos lamelares é mais rápida, objetiva, requer menor volume de amostra, estrutura laboratorial acessível, além de ter se mostrado benéfica para valores intermediários. Segundo esses autores a maior vantagem é que a contaminação do líquido amniótico com mecônio e sangue não interfere nos resultados do teste.

PIAZZE et al. (2005) avaliaram a maturidade pulmonar pela contagem de corpúsculos lamelares presentes no líquido amniótico de gestantes com $33,5 \pm 3$ semanas de gestação, e observaram que o teste apresenta boa acurácia, desde que se exclua gestações acima de 37 semanas pois poucas gestantes autorizam a realização do mesmo.

BONGSO & BASRUR (1977) já ressaltavam a importância da avaliação citológica dos fluidos fetais na espécie bovina como indicativo da maturidade do concepto. Em 1978, Bongso e colaboradores indicaram a avaliação citológica como técnica eficaz na determinação pré-natal do sexo do feto. A técnica de citologia de Azul de Nilo (0,1%) ou índice cito-lipídico consiste na mistura de uma gota de líquido amniótico com uma gota de corante, homogeneização e posterior leitura em microscopia óptica (NOMURA et al., 2001). Esta técnica permite a classificação celular quanto ao grau de maturidade, pois quanto mais vermelho-amarelado mais maduro (CAMPANA et al., 2003).

A determinação da absorvância do líquido amniótico em espectrofotômetro colorimétrico se realiza comparando o líquido tendo como controle a água destilada. Valores superiores a 0,150 indicam maturidade pulmonar em humanos (MARTÍNEZ et al., 1999).

A técnica que avalia a relação lecitina/esfingomielina é realizada em cromatografia de capa fina apresenta resultados confiáveis, porém requer uma estrutura laboratorial onerosa por isto é pouco utilizada (MARTÍNEZ et al.,

1999). De acordo com DALENCE et al. (1995) esta técnica é demorada, trabalhosa e tecnicamente dependente de estrutura incompatível com pequenas localidades.

O teste proposto por Clements e colaboradores em 1972 ou Shake Test preconiza seis diluições do líquido amniótico (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 e 0,5mL), acrescido de solução fisiológica (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5mL) e ainda 1mL de etanol a 95% em todos os tubos. Tem como base a capacidade do sistema surfactante de formar bolhas estáveis na interface ar-líquido, na presença de etanol. Quanto maior a quantidade de surfactante maior será a estabilidade das bolhas. Para RODRIGUEZ-MACIAS (1995) o teste proposto por Clements é rápido, simples e barato para determinar a maturidade pulmonar fetal, porém resultados intermediários ou negativos são questionáveis. Resultados controversos também são encontrados com a leitura da absorvância a 650 nm, pois apresenta muito falso-positivo (MARTÍNEZ et al., 1999).

NOMURA et al. (2001) indicaram o teste de Clements em três tubos, a densidade óptica em espectrofotômetro colorimétrico a 650nm e a contagem de células orangeofílicas coradas com azul de Nilo a 0,1% como métodos diagnóstico ideais para se predizer a maturidade fetal em humanos. Para MORRISON et al. (1978) a citologia de Azul de Nilo a 0,1% avalia a maturidade das células da epiderme fetal oriundas da descamação natural, sugerindo que a maturidade da pele ocorra ao mesmo tempo da maturidade pulmonar fetal. Para CAMPANA e colaboradores (2003) as células em escamas presentes no líquido amniótico são provenientes da membrana amniótica e do próprio feto.

SOCOL e colaboradores em 1990 propuseram um teste (Tap Test) para avaliar a maturidade pulmonar de neonatos e consiste na diluição de 1mL de líquido amniótico com 1mL de etanol a 95%, centrifugação por 20 segundos e observação da presença de bolhas na superfície líquido-ar em até 15 minutos. Este teste também é considerado rápido, prático e barato além de boa alternativa para uso em diferentes países. Para KUCHENBECKER et al. (2002) o Tap Test e a absorvância a 650nm são os mais indicados para se avaliar maturidade pulmonar fetal.

KUCUK (1998) comparou o Tap Test, e o Teste de Clements com a avaliação enzimática de fosfatidilglicerol de 180 mulheres gestantes de alto risco. O Tap Test foi indicado pelos autores como o método diagnóstico mais adaptável para avaliação fetal em hospitais distantes dos grandes centros. A avaliação enzimática de fosfatidilglicerol foi considerada a melhor técnica, porém é necessária estrutura laboratorial. Estes testes foram considerados mais confiáveis que o Teste de Clements.

Segundo FREDDI et al. (2003) a administração de surfactante exógeno em pacientes com a síndrome do desconforto respiratório reduz de maneira marcante a mortalidade neonatal humana, sendo esta terapêutica considerada uma das principais intervenções. Reforçando a idéia de que quanto mais cedo for instituído o tratamento melhores serão os resultados (REBELLO et al., 2002).

Segundo KOTERBA & PARDIS (1990) a maturação dos pneumócitos tipo II e do sistema surfactante pulmonar nos eqüinos ocorre durante o último quarto período da gestação. Relatos sobre a funcionalidade da estrutura pulmonar dos cães datam da década de 60, quando eram utilizados como modelos experimentais para os humanos (REEDY et al, 1995).

O mecônio é considerado um potente inibidor dos surfactantes (FREDI et al., 2003); além de suas características obstrutivas e inflamatórias, determina um aumento da tensão superficial resultando em múltiplo colapamento alveolar e comprometimento da função respiratória (REBELLO et al., 2002).

Em experimento realizado por SUN et al. (1993) com coelhos recém-nascidos tratados com surfactante suíno exógeno (200mmHg) após aspiração induzida de mecônio, foi observado melhora na oxigenação e complacência pulmonar. Neonatos suínos com a síndrome da angústia respiratória aguda e tratados com surfactantes também apresentaram sinais de efeitos benéficos no quadro respiratório (BALARAMAN et al., 1998). O primeiro estudo a abordar a questão de utilização de surfactante em animais como terapêutica datam da década de 80, utilizando cordeiros prematuros (REBELLO et al., 2002).

As proteínas representam quase 10% da massa do surfactante, sendo conhecidos quatro tipos (SP-A, SP-B, SP-C e SP-D). A composição química, função específica e porcentagem de cada proteína sofre alteração de acordo com a espécie animal (REBELLO et al., 2002). Os surfactantes comerciais derivados de extrato de pulmão de suíno, extrato de pulmão bovino, lavado de pulmão bovino e surfactante artificial contêm as proteínas do surfactante B e C, e são amplamente usados na medicina neonatal humana (REBELLO et al., 2002; FREDDI et al.; 2003).

Para MELLOR & SLATER (1974) a formação e composição dos fluidos fetais sofre influência da urina fetal, fluido pulmonar, secreções bucais e nasofaríngeas bem como do equilíbrio entre o sangue fetal, o próprio líquido e a deglutição realizada pelo feto. No decorrer da gestação acontece o completo desenvolvimento do feto com mudanças que vão desde o crescimento ósseo até a maturidade renal e pulmonar. Em fetos humanos a maturidade funcional dos rins ocorre após o nascimento (MOORE & PERSAUD, 1998); porém a filtração glomerular já está presente por volta da nona semana de gestação (ÇAGDAS et al., 2000) com a velocidade da filtração aumentando progressivamente (MOORE & PERSAUD, 1998). Disfunções do sistema urinário contribuem com 14-18% do total das anomalias congênicas, ficando abaixo apenas das anomalias do fechamento do tubo neural (ÇAGDAS et al., 2000).

A regulação do volume do líquido amniótico pelo feto humano é feita em parte pela deglutição (BELFORT & ORLANDI, 1983), considerando esta que ROBERTS (1971) extrapola como mecanismo de regulação do líquido amniótico animal. Entretanto, HAFEZ (1995) acredita na possibilidade desta regulação estar vinculada ao sistema endócrino e rins fetais.

Para BONGSO et al. (1978) o feto bovino eliminaria urina no líquido amniótico por volta de 76 a 164 dias utilizando o canal uretral. Posteriormente passaria a eliminar na vesícula alantoideana utilizando para isto o úraco. Em ovinos o fluxo de urina para a cavidade amniótica aumenta após 80 dias de gestação, e decresce gradativamente até 100 dias sendo drenado para a cavidade alantoideana. BRADLEY & MISTRETTA (1973) observaram que a

micção tem uma forte correlação com o volume do líquido amniótico deglutido, pois o volume de urina produzido pelo feto ovino dos 120 dias até o parto varia de 173 a 633 mL/dia, sendo similar ao volume deglutido de fluido amniótico.

O rim fetal é afuncional durante o seu período de formação, porém sua contribuição no final do processo de maturação fetal é importante para a sobrevivência do animal. A produção de urina está subjugada a uma série de mecanismos renais, e o volume e a composição dos fluidos corpóreos fetais influenciam diretamente a ação destes mecanismos, como também a disponibilidade de água e eletrólitos maternos (LUMBERS et al., 1985).

A cavidade alantoideana surge na segunda ou terceira semana de gestação no feto bovino, estando completamente formada entre os dias 24 e 28 após a concepção (ROBERTS, 1971). De acordo com MELLOR et al. (1975) a formação do líquido alantoideano é mais simples, estando a urina fortemente envolvida. Entretanto para ROBERTS (1971) antes de atingir a funcionalidade renal, o líquido teria origem no próprio epitélio alantoideano podendo também ser proveniente de absorção do lúmen uterino. Em fetos humanos a vesícula alantoideana surge por volta do dia 16 pós-fertilização, origina o úraco e está envolvida na formação da bexiga (MOORE & PERSAUD, 1998).

PRADO e colaboradores (1990) avaliando líquido amniótico de mulheres gestantes (4-6 meses) identificaram 13 bandas protéicas que não estavam presentes no plasma materno e com isto deduziram que eram de origem fetal. Segundo estes autores a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) uni e bidimensional são técnicas relevantes para se caracterizar os polipeptídeos fetais presentes no líquido amniótico. Para BARRETO (2002) a observação de bandas protéicas do líquido amniótico e alantoideano de cadelas é possível através desta técnica.

ÇAGDAS et al. (2000) afirmaram que a determinação de microglobulinas via transvesical é útil na avaliação da função renal fetal, sendo o diagnóstico confirmado perante a presença de microglobulinas no fluido amniótico. Estas proteínas apresentam baixa massa molecular com variação entre 10 a 30 kDa, sendo facilmente reabsorvidas no tubo proximal. Com o avanço da gestação as

células do tubo proximal ficam mais maduras aumentando a capacidade de absorção, favorecendo a transferência destas proteínas para o ambiente amniótico. Segundo OLIVEIRA e colaboradores (2002) a maturidade renal é definida pelo aumento da filtração glomerular e pela maturidade das células tubulares observada através do transporte de diversas moléculas no decorrer da gestação.

Para GORDON & FERRÁ (1999) proteínas de massa molecular maior que 30 kDa também podem ser utilizadas como ferramentas no diagnóstico de alterações da funcionalidade renal. HERVEY & SLATER (1967) afirmaram que o fluido renal dá origem às proteínas presentes nos líquidos fetais, pois as proteínas plasmáticas não atravessam a membrana fetal ovina e ainda apresentam variações conforme o fluido analisado e o tempo de gestação.

Realizando eletroforese em SDS-PAGE (11%) do líquido amniótico e de urina de neonato humano, ÇAGDAS e colaboradores (2000) observaram redução nos níveis da α_1 -microglobulina (33kDa) e da β_2 -microglobulina (11,8kDa) no líquido amniótico entre a 26^a e a 40^a semana de gestação, evidenciando a maturação e capacidade de absorção epitelial, mesmo sem a maturidade tubular estar completa. Ao se comparar as microglobulinas nos dois líquidos os autores não observaram diferença, afirmando que as microglobulinas presentes no líquido amniótico são originárias da urina fetal.

OLIVEIRA et al. (2002) avaliaram os níveis de β_2 -microglobulina no líquido amniótico e soro materno de mulheres gestantes, e observaram que devido a sua baixa massa molecular e por 99% estar na forma livre, ela era rapidamente eliminada por filtração glomerular do feto. ÇAGDAS et al. (2000) também observaram que a β_2 -microglobulina tem uma permeabilidade diferenciada no túbulo proximal fetal.

De acordo com PENDERS & DELANGHE (2004) a α_1 -microglobulina é uma proteína imunomoduladora com uma larga aplicação clínica no diagnóstico de alterações da função tubular. Estes autores afirmaram que sua massa molecular é de 27kDa, está presente em vários fluídos corpóreos, pode apresentar como sinônimos proteína-HC e α_1 -microglicoproteína. LINDQVIST &

AKERSTROM (1996) isolaram e caracterizaram a α_1 -microglobulina presente no fígado e urina bovina, encontrando uma proteína de massa molecular de 23,3kDa.

GULBIS et al. (1998) avaliando a composição do líquido amniótico de mulheres gestantes entre 11 e 16 semanas portando fetos com trissomia (18 e 21), observaram que a β_2 -microglobulina apresentou níveis elevados tanto na trissomia 18 quanto na 21 mesmo havendo redução na produção de proteínas e enzimas, devido ao atraso na maturação de vários órgãos. De acordo com OLIVEIRA e colaboradores (2002) a β_2 -microglobulina produzida pelo feto é filtrada e reabsorvida pelos túbulos proximais com redução da concentração depois de 36 semanas em gestações de fetos saudáveis. Esta redução é considerada um marcador da maturação da função renal. De acordo com os dois grupos de pesquisadores citados, a cariotipagem fetal é um exame complementar pois auxilia na compreensão dos valores da β_2 -microglobulina.

Pesquisas visando detectar marcadores protéicos da maturidade fetal humana estão favorecendo o diagnóstico prematuro de patologias ainda intra-utero. Além de proteínas de baixa massa molecular como as microglobulinas (ÇAGDAS et al., 2000), outras proteínas como a alfa-fetoproteína estão sendo associadas com a maturidade fetal (GULBIS et al., 1998; CAMPANA et al., 2003).

A alfa-fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína presente no sangue fetal sendo sintetizada pelo saco vitelino e, posteriormente, pelo trato gastrointestinal e fígado do feto tanto em humanos quanto nos animais (YAMADA et al., 1995; MOORE & PERSAUD, 1998; CAMPANA et al., 2003). Para MAESTRI et al. (1988) pequenas quantidades podem ser produzidas pelos rins e placenta; porém NEWBY et al. (2005) questionaram a possibilidade da síntese placentária, pois acreditam que a presença de AFP na placenta reflita somente o transporte transplacentário.

BELFORT & ORLANDI (1983), KJELDSBERG & KNIGHT (1993), MAESTRI et al. (1998) e CAMPANA et al. (2003) acreditam que a alfa-fetoproteína está altamente relacionada com a maturidade do concepto, pois

ela passa da urina fetal para o líquido amniótico. Os valores fisiológicos da AFP estão relacionados com a metodologia utilizada para detecção e sua função biológica específica é desconhecida (MAESTRI et al., 1998; CAMPANA et al., 2003).

Em humanos é possível avaliar o soro materno, o sangue fetal e o líquido amniótico devido à permeabilidade da placenta às proteínas plasmáticas fetais (MAESTRI et al., 1998; ÁLVAREZ-NAVA et al., 2003). Para NEWBY et al. (2005) é possível se detectar a AFP a partir da sexta semana de gestação. A constatação clínica de AFP em humanos e animais é correlacionada com carcinoma hepatocelular e tumores das células embrionárias (YAMADA et al., 1995; MAESTRI et al., 1998).

A AFP é considerada um marcador bioquímico de inestimável valor para o diagnóstico pré-natal de alguns defeitos de formação congênita fetal (GORDON et al., 2003; ÁLVAREZ-NAVA et al., 2003). A associação de níveis elevados com defeitos no fechamento do tubo neural é conhecida desde a década de 70 (SEPULVEDA et al., 1995; MAESTRI et al., 1998). Pesquisas indicam que a associação dos níveis de AFP, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e estradiol não conjugado (μE_3) em diagnóstico clínico reduzem a taxa de falso-positivo (ÁLVAREZ-NAVA et al., 2003). De acordo com CAMPANA et al. (2003) e GORDON et al. (2003) a interpretação da dosagem de AFP materna deve ser associada com a idade, etnia e peso da mãe, além do tempo gestacional e grau de nutrição.

Várias patologias são associadas a níveis elevados da AFP sérica materna (CAMPANA et al., 2003), todas relacionadas a condições que permitem a passagem de proteínas plasmáticas do feto para o líquido amniótico através da parede abdominal (MAESTRI et al., 1998). Níveis baixos são associados a trissomia cromossômica como a síndrome de Down, doença trofoblástica, morte fetal e aumento do peso gestacional (CAMPANA et al., 2003; GORDON et al., 2003; ÁLVAREZ-NAVA et al., 2003).

SEPULVEDA et al. (1995) e ÁLVAREZ-NAVA et al. (2003) recomendaram que a avaliação ultra-sonográfica fetal com aparelhos de alta resolução deva

ser sempre associada à dosagem de AFP com intuito de se detectar a má formação fetal e evitar falso-positivo. MAESTRI e colaboradores (1988) estudando líquido amniótico de gestantes entre 14 e 21 semanas observaram diminuição gradativa para os níveis de AFP encontrando 16,32 e 4,47 KUI/mL respectivamente. ÁLVAREZ-NAVA et al. (2003) observaram níveis de 31,09 ng/mL para mulheres com 15 semanas de gestação e 74,78 ng/mL para as que se encontravam na 20^a semana.

YAMADA et al. (1995) avaliando os resultados de dosagem de AFP de cães com reagentes humanos observaram inconsistência, encontrando grandes variações. Segundo estes autores a diversidade observada foi em decorrência da sensibilidade dos testes, ficando clara a importância de se estabelecer métodos específicos para a AFP canina. Desta forma deu-se a purificação da AFP presente no líquido amniótico fetal canino por cromatografia de afinidade, confirmada por imunoelektroforese e eletroforese em SDS-PAGE.

SMITH et al. (1979) avaliaram a distribuição da AFP por radioimunoensaio nos fluidos fetais de fetos bovinos com 3 a 4 meses de gestação encontrando 27-31 µg/mL no líquido alantoideano com diminuição com o progresso da gestação atingindo a 3 µg/mL próximo ao parto. No líquido amniótico os valores encontrados variaram de 17 a 25 µg/mL com 3 a 4 meses de gestação, chegando a <1-5 µg/mL próximo ao parto. LAI et al. (1979) *apud* SMITH et al. (1979) observaram que no plasma materno de vacas gestantes o valor encontrado para AFP foi de 0,010-0,021 µg/mL, e em vacas não gestantes o nível médio chegou a 0,023±0,008 µg/mL.

LAI e colaboradores (1978) determinaram a concentração de AFP por radioimunoensaio no líquido amniótico, soro fetal e materno de ovinos. Os dados obtidos revelaram valores elevados no terço final da gestação quando o fluido analisado foi o amniótico e o soro materno apresentando uma tendência a elevação. Estes autores acreditam que embora com distribuição fisiológica similar no líquido amniótico e no soro fetal de ovinos e humanos, no soro materno os níveis são diferentes e a função da AFP estaria relacionada com o tempo gestacional nas duas espécies.

BAETZ et al. (1981) dosaram a AFP por radioimunoensaio no plasma sanguíneo de vacas gestantes (4-5 meses) expostas a infecção por *Sarcocystis cruzi*, *Campylobacter fetus* ou *Aspergillus fumigatus*, obtendo valores de $6,5 \pm 5,0$ mg/mL e após o abortamento ou parto estes valores chegaram a $25,0 \pm 8,0$ mg/mL. Segundo estes autores os dados indicaram que a AFP não deve ser utilizada como ferramenta diagnóstica do sofrimento ou morte fetal, pois a inflamação ou necrose dos placentomas não se refletiu nos valores médios encontrados.

YAMADA et al. (1995) purificaram e dosaram a AFP de líquido amniótico, soro fetal e soro de cadelas gestantes e não gestantes. Os valores encontrados para o soro dos neonatos ao nascimento foi de $14,08 \pm 5,94$ mg/mL⁻¹ e após uma semana de vida $0,776 \pm 0,758$ mg/mL⁻¹. Estes dados foram considerados altos quando comparados com descrições em humanos, suínos e bovinos. Ressalta-se que a média encontrada para cadelas gestantes ou não ($7-63$ ng/mL⁻¹), não foi diferente.

Em humanos a massa molecular da AFP é descrita com aproximadamente 69 kDa (MAESTRI et al., 1998). No líquido amniótico de cadelas foi encontrado uma massa molecular de 66 kDa, e aproximadamente 2mg de AFP em 50mL de líquido amniótico, porém o líquido alantoideano não foi avaliado (YAMADA et al., 1995). Níveis elevados de AFP são descritos em gestações com fetos humanos pequenos, prematuros ou gestações gemelares, níveis baixos são associados a retardo do crescimento com alta possibilidade de parto prematuro (HAU et al., 1981; GORDON et al., 2003).

GORDON e FERRÁ (1999) e ÁLVAREZ-NAVA et al. (2003) indicaram a dosagem de AFP e a avaliação fetal com o ultra-som para se detectar defeitos congênitos, principalmente falhas no fechamento do tubo neural. Na literatura há descrição de diferentes formas moleculares da AFP, porém nem todas são formas reativas. A concanavalina A (Com A) é uma forma não reativa da AFP humana, com baixos níveis no líquido amniótico de fetos com defeitos no tubo neural quando comparado com líquido de fetos normais (HAU et al., 1981). Em humanos a AFP presente no líquido amniótico foi altamente correlacionada com fatores de crescimento hematopoiéticos fetais (BARTHA et al., 2000).

Para GULBIS et al. (1998) a concentração de AFP é mais alta no líquido amniótico quando comparado com o soro materno humano, e tem como origem até a 12^a semana de gestação o saco vitelino. Embora associada à má formação do tubo neural, a AFP é válida também para predizer a trissomia cromossômica 21 (síndrome de Down).

SALAS et al. (2002) observaram alterações congênitas em humanos associadas com defeitos no fechamento do tubo. A ausência de dosagem da AFP em pacientes com indicação de assistência genética promoveu reflexos no aumento da taxa de malformações ao nascimento devido à ausência do diagnóstico. Porém SEPULVEDA et al. (1995) afirmaram que é possível a paciente apresentar alta taxa de AFP no líquido amniótico e na avaliação ultrassonográfica não ser observada nenhuma má formação.



Material e Métodos

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Grupo Experimental

As amostras (n=40) foram colhidas de cadelas gestantes (n=16) que foram submetidas à cesariana por indicação veterinária, e atendidas no Setor de Obstetrícia de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu. A idade gestacional foi determinada pelos sinais clássicos de início de parto, avaliação ultra-sonográfica¹ e aparência dos fetos. A raça, peso e idade das cadelas não foram levados em consideração visto que a unidade de estudo foram os fetos com os anexos embrionários.

4.2- Colheita do Material

Os animais foram tricotomizados na região do abdômen e submetidos à anestesia, segundo os diferentes protocolos instituídos pelo setor de anestesiologia e antissepsia. Após a incisão pré-retroumbilical na linha alba, os cornos uterinos foram expostos para visualização das vesículas gestacionais e colheita das amostras.

Após a identificação das vesículas dispostas em cada corno procedeu-se a incisão uterina. A região com menor vascularização das membranas fetais foi à eleita para o procedimento a fim de se evitar contaminação por sangue, sendo realizada com seringa graduada de 5,0mL acoplada a agulha descartável (40x16mm). Com o intuito de proceder à identificação dos fluidos realizou-se dissecação da membrana corioalantóideana e, posteriormente, da amniótica. Quando da realização do procedimento ocorreram perdas significativas de fluido o que mascarou o volume total, pois durante a colheita e rompimento das membranas, se priorizou o conforto respiratório do neonato. Após a colheita do material e retirada dos fetos, seguiu-se a síntese do útero, da parede muscular abdominal, tecido subcutâneo e pele seguindo técnica convencional.

¹ Scanner 240 – Pie Medical

O material em duplicata foi depositado em tubos plásticos de 1,5mL com tampa, previamente identificados. Uma alíquota foi retirada para avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro, teste de Clements modificado e avaliação citológica. As amostras foram então armazenadas em freezer à menos 20°C para dosagem de proteínas totais e eletroforese

4.3- Assistência pós-operatório

Todos os animais receberam assistência e acompanhamento trans e pós-operatório, baseado em antibioticoterapia (Penicilina, 30.000UI/Kg, SC)² sendo a dose repetida após três dias. Depois de sete dias os pontos da pele foram retirados. Todos os neonatos foram submetidos à assistência neonatal, mantidos em local aquecido até a total recuperação pós-operatória da parturiente. Testou-se o reflexo de micção com a passagem de pano úmido na região genital dos neonatos, observando-se a presença de urina. Os que vieram a óbito até sete dias pós-parto foram excluídos do experimento.

4.4- Determinação de surfactantes fetais

As amostras foram avaliadas no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS). Todos os testes seguiram recomendações dos profissionais do Laboratório de Líquidos do Setor de Laboratório Clínico da Faculdade de Medicina da UNESP (Campus Botucatu) e foram adequadas conforme sugerido.

Teste Citológico com Azul de Nilo - cada amostra foi homogeneizada e uma gota (50uL) foi depositada sobre uma lâmina de vidro. Uma gota (50uL) de corante Azul de Nilo a 0,1% foi acrescida e homogeneizada. O material foi coberto com uma lamínula e observado a microscopia óptica com objetiva de 100x. As porcentagens de células orangeofílicas (vermelho-amarelado) foram relacionadas com as cianofílicas (azuladas). Proporção superior a 10% foi considerada significativa de maturidade fetal.

Teste de Clements “modificado” - tem como base a reação de saponificação dos surfactantes presentes. Realizou-se diluições gradativas dos fluidos com etanol a 95%, observando-se um halo de espuma nos tubos de

² Penicilina G Benzatina- EMS

ensaio (Tabela 1). O halo recebeu valores de 0 – 4 de acordo com sua intensidade. Optou-se pela exclusão da diluição com 1mL de solução fisiológica como preconiza o teste inicialmente em todos os tubos, pois com sua presença não houve formação de bolha. Houve também exclusão da maior (1 mL) e menor (0,5 mL) diluição em virtude do volume colhido.

TABELA 1- Diluições para o teste de Clements modificado para a avaliação de surfactantes em líquido amniótico e alantoideano de fetos caninos.

Tubos	Líquido fetal	Etanol 95%
1	0,9mL	1mL
2	0,8mL	1mL
3	0,7mL	1mL
4	0,6mL	1mL

Teste de Densitometria Óptica (DO) a 650nm- Uma alíquota de cada fluido foi centrifugada por 10min a uma velocidade de 2.500rpm. O sobrenadante foi colocado em cubetas de quartzo, levadas ao espectrofotômetro colorimétrico (B582, Micronal, Brasil) e lidas em comprimento de onda de 650nm, utilizando água destilada como branco. Quando o DO foi superior a 0.150 o feto foi considerado maduro seguindo padrão utilizado na medicina humana.

4.5- Determinação de proteínas totais, proteínas de baixa massa molecular e da proteína de 66kDa de massa molecular.

As amostras foram centrifugas a 5.000rpm/1h/-4°C. Para a determinação da concentração de proteínas totais das amostras de fluidos fetais utilizou-se à metodologia de Bradford modificado³. As proteínas presentes reagem com o corante Coomasie azul brilhante, sendo as variantes do azul correlacionadas com as concentrações protéicas. O ponto de absorção máxima para as concentrações protéicas foi a 610nm ou filtro laranja, com leitura realizada em

³ Micropote – DOLES Reagentes

espectrofotômetro colorimétrico (B582, Micronal, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL.

A determinação de proteínas de massa molecular inferior a 40kDa e de massa próximo de 66kDa, foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida acrescida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme descrito por LAEMMLI (1970) e referendado para os líquidos fetais caninos por BARRETO (2002). Proteínas de massa molecular inferior a 40kDa foram consideradas indicativas de funcionalidade renal devido a falta de dados em cães, e próximas de 66kDa foram consideradas alfa-fetoproteína.

Em cada gel foram aplicadas amostras dos líquidos amniótico e alantoideano e um marcador de baixa massa molecular 10 a 250kDa (Rainbow Molecular Weight Markers- Amersham Pharmacia Biotech). Amostras com indícios de contaminação com mecônio ou sangue foram excluídas. Após a confecção, os géis foram corados com Coomassie Blue R-250, descorados e posteriormente corados com Nitrato de Prata para evidenciação das bandas protéicas utilizando-se gel de poliacrilamida na concentração de 12%. Para tanto, em cada gel foi adicionada uma média de 5mg/ μ L de proteína total dos líquidos amniótico e alantoideano no gel de separação. Como a concentração de proteína total em algumas amostras foi menor do que o valor citado, utilizou-se a concentração total da amostra.

Para a confecção dos géis e corrida eletroforética utilizou-se duas placas de vidro limpas previamente com álcool etílico a 96%, medindo 10x8cm, sendo montadas por justaposição e separadas por espaçador de polietileno com 1,0mm de espessura. A preparação das soluções utilizadas na corrida eletroforética e dos corantes foram realizadas conforme anexo I e II. Após a montagem da cuba eletroforética⁴, o gel de separação foi preparado e vertido entre as placas de vidro. Um período de 15 a 30 minutos foi aguardado para que a polimerização do gel ocorresse. Durante este intervalo, as amostras foram preparadas, de forma que aquelas contendo 5mg/ μ L de proteína total fossem diluídas em tampão da amostra na proporção de 1:4 (tampão:amostra),

⁴ Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System - Amersham Pharmacia Biotech

e fervidas à $\pm 100^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. O gel de empilhamento a 5% foi então preparado e vertido sobre o gel de separação. Um molde de polietileno em forma de pente foi acomodado sobre o gel de empilhamento de modo a formar canaletas para permitir a aplicação das amostras.

Após a polimerização do referido gel o molde foi retirado e os módulos contendo as placas foram colocados na cuba de corrida de eletroforese, onde foi adicionado o tampão de corrida já diluído na proporção de 1:4 (tampão:água). As amostras foram aplicadas às canaletas do gel e em uma canaleta específica foi aplicado uma alíquota do marcador de massa molecular a título de identificação e comparação das bandas.

A cuba foi ligada a uma fonte estabilizadora para Eletroforese⁵ com uma miliamperagem constante de 24mA (12mA/gel) e voltagem máxima de 244V, num período médio de 2 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e colocado em uma vasilha plástica onde foi corado. As colorações empregadas foram Coomassie Azul Brilhante R-250 e Nitrato de Prata. Inicialmente para verificação da separação (Coomassie Azul Brilhante), e então descorados e corados novamente (Nitrato de Prata) para avaliação das bandas. As imagens dos géis foram obtidas por um capturador de imagens (hp Scanjet 3200C), e posteriormente armazenados em vasilhas plásticas com água MilliQ em geladeira, a 4°C. A leitura da imagem digitalizada dos géis foi realizada em um Analisador de Imagens com software⁶ próprio para este fim no Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências- UNESP (Campus de Botucatu), observando a massa protéica e a IOD de cada banda.

4.6- Dosagem de cortisol

As determinações das concentrações de cortisol nos líquidos fetais foram realizadas por meio da técnica de radioimunoensaio de fase sólida com cortisol marcado com ^{125}I utilizando-se para tanto o kit de cortisol da COAT-A-COUNT (DPC®-Diagnostic Products Corporation – Los Angeles, CA, USA). A técnica é baseada em anticorpos específicos contra o cortisol imobilizado na parede dos tubos de propileno. O cortisol marcado compete por um período fixo de tempo

⁵ EPS 300 Power Supply – Amersham Pharmacia Biotech

⁶ Image Master VDS and Analysis Software – Amersham Pharmacia Biotech

com o cortisol da amostra para os sítios dos anticorpos. A radiação é proporcional à quantidade de antígeno ^{125}I ligado ao anticorpo.

A quantidade de cortisol nas amostras foi determinada a partir de uma curva de calibração que acompanha o “kit” comercial. A contagem foi realizada em contador gama (CobraTMII Auto-Gamma, Packard, Brasil), e os resultados expressos em $\mu\text{g/dL}$. A concentração de cortisol a 90% do B0 foi de $0,8\mu\text{g/dL}$; ligação inespecífica $1,24 \pm 0,11\%$ (Média \pm EPM) e o coeficiente de variação intra-ensaio 8,17% (RODBARD, 1974). Não houve coeficiente de variação inter-ensaio pois foi utilizada uma única curva de calibração e as dosagens foram realizadas em um único teste.

4.7- Análise Estatística

Os dados obtidos nas avaliações propostas foram explorados quanto ao cálculo de medidas descritivas (média e desvio padrão) com construção de tabelas e gráficos. Testou-se nos fluidos, as variáveis e a interação entre eles, ajustando os modelos hierárquicos onde o efeito das mães e dos fetos foram aleatórios.

As diferenças que apresentaram probabilidade de significância menor que 5% foram consideradas significativas para o teste-t. As análises foram executadas através do Proc Mixed, SAS versão 6.12. Na avaliação das densidades ópticas integradas e das massas das bandas protéicas foi efetivado cálculo de medidas descritivas (média e desvio padrão) com o auxílio do excel.



Resultados

4- RESULTADOS

Os valores encontrados (média e desvio padrão) no líquido amniótico (n=40) e alantoideano (n=40) de cadelas gestantes (n=16) para Teste de Clements (TC) (0,9; 0,8; 0,7; 0,6), Citologia (Azul de Nilo 0,1%), Densidade Óptica (DO), Proteínas Totais (PT) e Cortisol encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2- Valores (média e desvio padrão) para o Teste de Clements (TC), Citologia, Densidade Óptica (DO), Proteínas Totais (PT) e Cortisol presentes no líquido amniótico e alantoideano (n=40) de cadelas gestantes (n=16).

Variáveis	Líquido Amniótico	Líquido Alantoideano
TC 0,9	2,13 ± 0,16 ^a	0,6 ± 0,78 ^a
TC 0,8	1,23 ± 0,95 ^a	0,18 ± 0,38 ^a
TC 0,7	0,45 ± 0,64 ^a	0,03 ± 0,16 ^a
TC 0,6	0,13 ± 0,4	0,03 ± 0,16
Citologia (%)	92,8 ± 10,46	94 ± 4,56
DO	0,220 ± 0,190	0,250 ± 0,02
PT (mg/dL)	22,29 ± 16,19 ^a	37,86 ± 12,52 ^a
Cortisol (µg/dL)	0,82 ± 0,54 ^a	1,55 ± 0,69 ^a

^a indica diferença significativa entre linhas p<0,05

Quando se avaliou as bandas presentes no gel de eletroforese com massa molecular próxima a 66 kDa, observou-se grande variação nos valores máximos e mínimos para a IOD como observado na Tabela 3. Além da observação da ausência desta banda em várias amostras de líquido amniótico e alantoideano

TABELA 3- Valores médios (valores mínimos/máximos) da Densidade Óptica Integrada (I.O.D.) da banda protéica de massa de 66 kDa presente no líquido amniótico (35/40) e alantoideano (27/40) de cadelas gestantes (n=16).

	Líquido Amniótico (n=35)	Líquido Alantoideano (n=27)
Média	15,94	13,3
Valores Mínimos	1,15	0,48
Valores Máximos	95,95	60,25

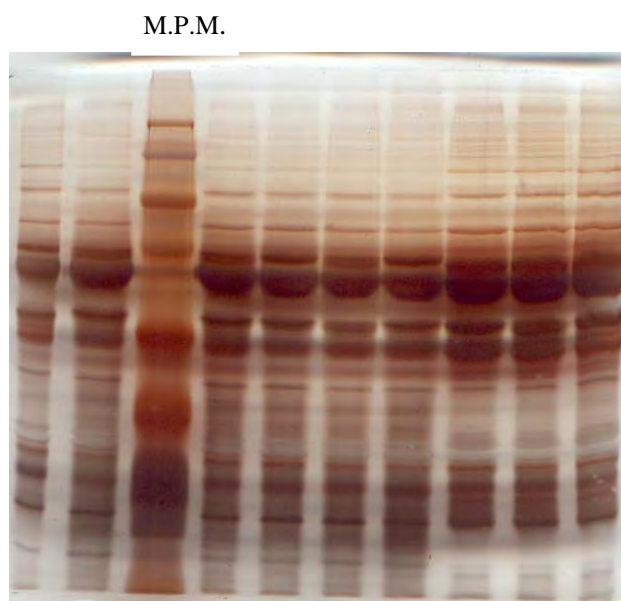
As massas e a IOD das bandas protéicas presentes nos líquidos amniótico e alantoideano observadas pela técnica de eletroforese em SDS-PAGE (12%) estão descritas na Tabela 4.

TABELA 4- Média da Densidade Óptica Integrada (I.O.D.) das bandas protéicas (kDa) observadas no gel de separação (12%) presentes nas amostras (n) de líquido amniótico e alantoideano de cadelas gestantes (n=16).

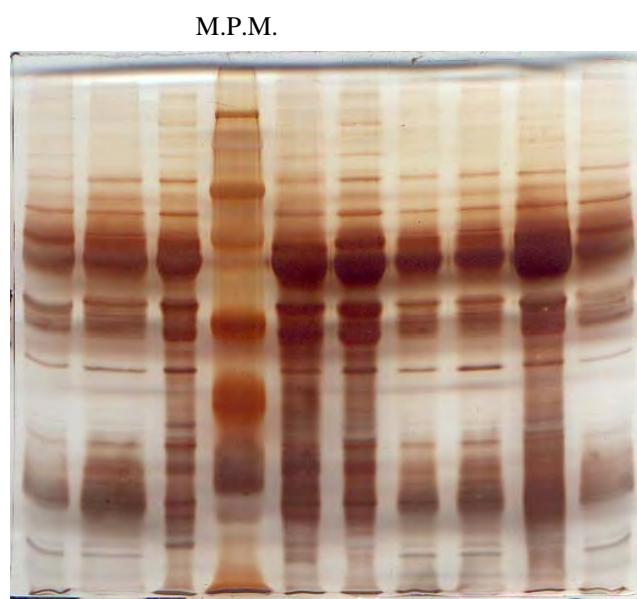
Bandas protéicas kDa	I.O.D.	
	Líquido Amniótico (n)	Líquido Alantoideano (n)
40	56,95 (16)	105,66 (4)
38	103,18 (13)	132,24 (12)
36	51,72 (1)	65,59 (12)
35	65,32 (2)	159,68 (3)
34	193,91 (34)	42,15 (15)
33	65,72 (11)	39,54 (15)
32	61,72 (26)	43,09 (29)
31	---	22,62 (5)
30	62,67 (33)	69,82 (32)
29	35,51 (19)	26,89 (8)
28	12,75 (28)	27,62 (26)
27	8,55 (8)	17,69 (2)
26	8,54 (5)	25,09 (28)
25	6,15 (4)	6,38 (4)
24	11,52 (26)	17,74 (12)
23	15,89 (2)	2,84 (3)

I.O.D.

22	15,5 (32)	7,71 (14)
21	3,23 (1)	---
20	36,32 (26)	28,57 (24)
19	---	12,73 (5)
18	25,88 (19)	45,88 (11)
17	47,68 (13)	28,29 (1)
16	14,97 (1)	63,27 (23)
15	43,74 (15)	37,93 (1)
14	68,84 (11)	46,85 (21)
13	43,18 (24)	49,33 (1)
12	43,08 (38)	66,14 (26)
10	17,44 (34)	41,27 (16)
9	---	51,76 (6)
8	8,01 (19)	14,64 (14)



A



B

FIGURA 1- SDS-PAGE das amostras de líquido amniótico (A) e alantoideano (B) de cadelas gestantes (n=16). A massa molecular das bandas protéicas foi expressa em kDa com padrão de massa molecular (M.P.M.).



Discussão

6- DISCUSSÃO

O cão foi a primeira espécie a ser domesticada pelo homem e embora sirva de modelo experimental para afecções que acometem outras espécies animais e o próprio homem, sua fisiologia obstétrica e neonatal apresenta uma carência muito grande de pesquisas para compreender este momento peculiar da vida.

Ao consultar a literatura disponível observa-se uma escassez de pesquisas a respeito da fisiologia obstétrica e neonatal nas cadelas, em particular trabalhos voltados para a determinação da maturidade fetal no momento do parto. Resultados encontrados nos fluidos fetais neste momento refletem a sincronia entre a fisiologia materna e a fisiologia do concepto, e geram subsídios sobre procedimentos que aumentem a viabilidade neonatal.

O procedimento cirúrgico (cesariana) realizado para obtenção dos fluidos fetais é bastante difundido no meio acadêmico o que favoreceu a intimidade com a técnica reduzindo perdas significativas no volume dos líquidos fetais, e retardos na assistência neonatal. A técnica anestésica foi sugerida pelo Setor de Anestesiologia do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, no intuito de se obter um plano anestésico satisfatório, que reduzisse a depressão fetal e favorecesse ao retorno do estado de consciência da mãe.

A transição da existência intra-uterina para a vida extra-uterina exige mudanças críticas e adaptações, principalmente, do sistema cardiovascular e respiratório. Neonatos que resistem às primeiras horas após o nascimento têm maior probabilidade de sobreviver (MOORE & PERSAUD, 2000). A colheita dos fluidos fetais, durante o procedimento da cesariana, requer cuidados especiais para se facilitar a respiração do neonato evitando a asfixia e manobras que impeçam perdas significativas do volume devido a lacerações nas membranas fetais. O reduzido volume das amostras colhidas durante o experimento dificultou as mensurações propostas, sendo o volume médio obtido de 5,0mL.

Foram colhido um total de 52 amostras de fluidos fetais de 16 cadelas, porém algumas apresentaram volume insuficiente para as análises propostas. Das 52 amostras somente em 40 foi observado paridade entre fluidos (amniótico:alantoideano) e volume adequado. Os testes realizados para predizer a maturidade pulmonar apresentam como característica marcante à facilidade de realização associada ao baixo custo o que favorece a utilização na rotina clínica.

O teste proposto por Clements e colaboradores em 1972 preconiza seis diluições do líquido amniótico (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 e 0,5mL), acrescido de solução fisiológica (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5mL) e ainda 1mL de etanol a 95% em todos os tubos. Ao realizar a técnica exatamente como proposta por Clements não se observou halo de espuma em nenhum dos tubos. Optou-se então pela não diluição das amostras com a solução fisiológica, obtendo-se assim resultados favoráveis (Teste de Clements modificado) conforme indicação do Laboratório de Líquidos do Setor de Laboratórios Clínicos da Faculdade de Medicina (UNESP-Campus de Botucatu). Devido ao volume reduzido dos fluidos fetais em decorrência de perdas no momento da colheita, e da necessidade para a realização das outras provas, definiu-se por retirar as diluições mais divergentes (1 e 0,5mL).

Das amostras testadas quanto a presença de halo de espuma com diluição de TC 0,9, não foi observado em 3 amostras (13; 24 e 26) de líquido amniótico; enquanto no alantoideano 23/40 não apresentaram halo. Creditamos a ausência de halo nas 3 amostras de líquido amniótico a provável contaminação com sangue ou mecônio, que impediria a sua formação. Segundo REBELLO et al. (2002) e FREDDI et al. (2003) a sua presença altera os resultados das diluições, pois interfere na formação das bolhas na interface ar-líquido. Os valores médios das diluições TC 0,9; TC 0,8 e TC 0,7 apresentaram diferença estatística entre os líquidos fetais com teste-t com $p < 0,05$. A análise desta diferença reforça a idéia de que a finalidade e o papel dos fluidos fetais na maturidade do concepto está intimamente ligada ao 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 colheita ou decorrente da inter-relação existente entre os dois compartimentos. Nas outras diluições (0,8; 0,7 e 0,6) os resultados encontrados para os dois líquidos foi o esperado e compatível ao descrito pela literatura em humanos (RODRIGUEZ-MACIAS, 1995). Segundo observado houve redução gradual da formação do halo no líquido amniótico nas diluições TC 0,8 ($1,23 \pm 0,95$), TC 0,7 ($0,45 \pm 0,64$) e TC 0,6 ($0,13 \pm 0,04$). Segundo Clements e colaboradores (1972) quanto maior a quantidade de surfactante, maior é a formação e estabilidade das bolhas presentes no halo; reforçando a hipótese de que quanto maior a diluição menor será o resultado, confirmando a evolução dos dados nos dois líquidos.

No líquido alantoideano as médias observadas para as diluições (0,8; 0,7 e 0,6) mostraram uma diminuição gradativa. Estes dados refletem o esperado de acordo com a literatura para líquidos contendo mecônio (REBELLO et al; 2002). A disposição anatômica da vesícula alantoideana reforça a idéia de que os valores encontrados para a avaliação de Clements deveriam ser insignificantes, visto que não é esperada a presença de surfactante neste compartimento (CHRISTIANSEN, 1988). Creditamos a média e o desvio padrão observados na diluição TC 0,9 do teste ($0,65 \pm 0,78$), à proporção líquido alantoideano:etanol 95% nesta diluição. Não há relatos na literatura da avaliação do líquido alantoideano na espécie humana, por ser estrutura vestigial (MOORE & PERSAUD, 1998), o que dificulta uma abordagem mais profunda. A presença acidental de líquido amniótico no momento da colheita do alantoideano não deve ser descartada, devido a necessidade do rompimento das membranas para favorecer a respiração do neonato (BARRETO, 2002).

Os dados da diluição TC 0,9 do líquido amniótico apresentaram correlação positiva com a diluição TC 0,8 ($r=0,791$), esta última apresentou correlação positiva com a diluição TC 0,7 ($r=0,549$) e com a TC 0,6 ($r=0,326$). Entre a diluição TC 0,7 e a TC 0,6 também foi observada correlação positiva ($r=0,571$). No líquido alantoideano o teste de Clements apresentou correlação positiva entre as diluições TC 0,9 e TC 0,8 ($r=0,582$), esta última também apresentou correlação com as diluições TC 0,7 ($r=0,348$) e TC 0,6 ($r=0,348$). A

observação de correlação entre as diluições justifica-se, pois o teste aborda a diferença gradativa na concentração de surfactantes.

Das amostras de amniótico, 4 (22; 32; 33 e 36) apresentaram formação de halo de espuma representativo. Destas, os fetos identificados como 32 e 33 eram da mesma mãe. A amostra 32 apresentou ainda reação para a diluição (TC 0,9) no líquido alantoideano, o que pode ser indicativo de problemas no momento da colheita. Observou-se a ausência do halo de espuma nas amostras 13; 24 e 26 do líquido amniótico o que pode ser questionado com base nas observações descritas na literatura da presença de resultados intermediários ou negativos (RODRIGUEZ-MACIAS, 1995).

Segundo KUCUK (1998) e KUCHENBECKER et al. (2002) os resultados do teste de Clements não são tão confiáveis, recomendando o Tap Test ou a absorvância a DO 650 como mais seguros. O Tap Test proposto por SOCOL e colaboradores (1990) exclue as diluições do teste de Clements e inclui centrifugação por 20 segundos; porém pesquisadores também ressaltam a necessidade de outros teste para fechar o diagnóstico de maturidade (MARTÍNEZ et al., 1999).

Os valores encontrados para a densidade óptica dos fluidos fetais foi 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. Das amostras avaliadas, 14 do líquido amniótico e 4 do alantoideano apresentaram valores inferiores aos recomendados na literatura para o líquido humano (MARTÍNEZ et al., 1999). Segundo estes autores amostras de líquido fetal com valor superior a 0,150 indica maturidade pulmonar.

Postulamos que o valor limítrofe deste teste para os fluidos fetais da cadela deva ser semelhante ao proposto para humanos. Creditamos os valores elevados observados no fluido alantoideano ($0,250 \pm 0,08$) com base no indicado no teste (0,150) do líquido humano a presença de debris celulares e mecônio, pois neste fluido é, facilmente, observado a coloração e densidade em cães (BARRETO, 2002), bem como em outras espécies (SOUZA et al., 1999; PRESTES et al., 2001).

Quando se confrontou os dados observados para a densidade óptica no líquido amniótico não houve correlação com nenhuma outra variável no líquido. No líquido alantoideano foi possível observar correlação negativa entre a densidade óptica das amostras deste fluido com o teste de Clements do líquido amniótico com diluição TC 0,8 ($r=-0,323$). Foi observada correlação negativa entre a densidade óptica e o teste de Clements com diluição TC 0,8 ($r=-0,334$) no líquido alantoideano.

Para a avaliação citológica com o corante Azul de Nilo a 0,1%, esperou-se a decantação dos dois fluidos por 10 minutos no intuito de se obter uma maior concentração de células visto que este teste não preconiza a centrifugação para promover concentração. Raras foram as amostras que apresentaram um número limitado de células, em todas foi contado um número total de 100 células. Uma amostra de líquido amniótico (40) apresentou somente 40% de células orangeofílicas diluindo a média observada para esta variável e aumentando o desvio padrão.

A proporção de células orangeofílicas/cianofílicas foi analisada e observou-se uma porcentagem de $92,8\pm 10,46$ para o líquido amniótico e $94\pm 4,56$ para o alantoideano de células orangeofílicas, porém na análise dos dados com o teste-t, não foi observada diferença estatística. De acordo com NOMURA et al. (2001) esta relação deve ser igual ou superior a 10% para considerarmos que o feto tem maturidade pulmonar. Valores entre 6 e 90% de células orangeofílicas devem ser considerados intermediários, e abaixo de 5% como imaturidade. As considerações acerca dos resultados do teste citológico observadas por estes autores foram encontradas nas amostra de fluido fetal canino deste estudo, com exceção de uma amostra já relatada.

Segundo CAMPANA et al. (2003) as avaliações citológicas promovem informações precisas sobre o ambiente uterino, e os variados tipos celulares descritos estão estritamente relacionado ao feto. BARRETO (2002) observou quatro tipos celulares no momento da cesariana: células imaturas (profundas), células medianamente maduras (intermediárias), células maduras não cornificadas (nucleadas), e hiper maduras anucleadas cornificadas (escamas).

Em amostras onde a presença de escamas (células queratinizadas/oregeanfílicas) foi superior a 90% sugere feto em estágio de pós-maturidade.

Durante a avaliação citológica observou-se à presença de debris celulares e pêlos, que segundo ROBERTS (1971) são achados discrepantes. Cientistas creditam a presença das células nos fluidos à ação esfoliante natural da superfície fetal (CAMPANA et al., 2003). KJELDSBERG & KNIGHT (1993) e GULBIS et al. (1998) indicam a avaliação da celularidade dos fluidos como eficiente diagnóstico para se detectar precocemente alterações comossômicas como, por exemplo, a Síndrome de Down. BONGSO & BASRUR na década de 70 já preconizavam a avaliação citológica como método diagnóstico da maturidade fetal.

Das amostras de líquido amniótico avaliadas para surfactantes 13 apresentaram teste de Clements nulo para as quatro diluições, citologia de 80% e DO 0,139. Na amostra 24 foi observado teste de Clements nulo, 90% de citologia e DO 0,377, enquanto a amostra 26 foi nula nas diluições de Clements, 100% de células orangeofílicas e DO 0,358. Estes resultados podem indicar a necessidade de utilização de pelo menos dois teste para se avaliar a maturidade aos moldes da metodologia utilizada em humanos (NOMURA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; CAMPANA et al., 2003).

Nas amostras de alantoideano em que se pesquisou surfactantes poucas apresentaram alguma reação ao teste de Clements (TC 0,9) (11; 16; 18; 26; 30; 31 e 32) e todas apresentaram reação significativa para a citologia com o Azul de Nilo 0,1% com quatro amostras com valores inferiores a 0,150 para o DO (18; 32; 33 e 38). A escassez de avaliações destes parâmetros neste fluido dificultou uma interpretação mais concisa, porém a resposta ao teste de Clements foi considerada dentro dos padrões. Os valores observados para a citologia não apresentaram correlação com nenhuma outra variável quando se confrontou os dados intra-líquidos, porém houve correlação positiva entre a citologia dos dois fluidos ($r=0,367$; $p<0,020$).

Dos elementos bioquímicos presentes nos fluidos fetais, as proteínas são encontradas em maior abundância; elas participam ativamente da formação celular e tecidual, e refletem a fisiologia renal e pulmonar, sendo influenciadas pelas excretas fetais (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993; MOORE & PERSAUD, 2000). A concentração média de proteínas totais do líquido amniótico ($22,29 \pm 16,19$) e alantoideano ($37,86 \pm 12,52$) ($p < 0,05$) refletem a fisiologia diferenciada nos dois compartimentos fetais. Os valores observados nos fluidos convergem com os dados apresentados por BARRETO (2002) e BRANCO et al. (2005).

A concentração protéica pode espelhar a função renal, pulmonar e o metabolismo materno-fetal (MOORE & PERSAUD, 1998). Para a realização da técnica de biologia molecular descrita por LAEMLLI (1970) é necessário dosar proteínas totais e segundo PRADO e colaboradores (1990) a eletroforese em SDS-PAGE é uma técnica que permite avaliar polipeptídeos presentes nos líquidos fetais. A concentração de proteínas totais apresentou correlação positiva com a densidade óptica do líquido amniótico ($r=0,985$), porém este dado não foi observado no alantoideano. A concentração de proteínas totais no líquido alantoideano só apresentou correlação com o teste de Clements na diluição TC 0,9 ($r=0,332$).

Com base em relatos de ÇAGDAS et al. (2000) e REBELLO et al. (2002) a excreta renal é a fonte de origem das proteínas presentes nos fluidos fetais, pois as proteínas plasmáticas não atravessam a membrana fetal ovina. Em 1974, MELLOR & SLATER, difundiam a idéia de que o fluido fetal sofre influência da urina, fluido pulmonar, secreções bucais e nasofaríngeas fetais, e que seria reflexo do equilíbrio do sangue fetal, do líquido fetal e da deglutição do feto.

BAETZ et al. (1976) relataram concentrações diminuídas de proteínas no líquido amniótico de bovinos, e SOUZA e colaboradores fizeram as mesmas observações em bufalinos. Segundo KJELDSBERG & KNIGHT (1993) e MOORE & PERSAUD (2000), os valores encontrados podem demonstrar a capacidade de utilização destas proteínas para promover a formação muscular do feto e/ou a sua nutrição.

Pesquisadores indicam a dosagem de alfa-fetoproteína (AFP) como meio diagnóstico para se detectar alterações no fechamento do tubo neural e a funcionalidade renal (GORDON & FERRÁ, 1999; NEWBY et al., 2005). Na literatura a massa molecular descrita para esta proteína em humanos é de 69kDa (MAESTRI et al., 1998) e em cães o descrito é de 66kDa (YAMADA et al., 1995). As concentrações registradas estão altamente correlacionadas com a técnica de dosagem utilizada (CAMPANA et al., 2003), e com a sensibilidade do teste (YAMADA et al., 1995) ocasionando divergências de dados.

Nas 40 amostras analisadas a banda de 66kDa de massa molecular foi identificada em 35 amostras de líquido amniótico não estando presente em 05 amostras (28; 29; 35; 36 e 37). No líquido alantoideano foi identificada em 27 amostras, não sendo possível identificar em 13 amostras. Foi observada a presença desta proteína em pelo menos um líquido de cada feto. A média da densidade óptica observada para a proteína de 66 kDa de massa foi 15,94 no líquido amniótico e 13,3 no alantoideano.

De acordo com REDDY et al. (1995) valores baixos de proteínas no líquido amniótico podem revelar a ausência de maturidade do rim fetal. PRESTES et al. (2001) analisaram líquido amniótico de ovelhas em três momentos da gestação (70, 100 e 145 dias) e também encontraram valores baixos para este elemento.

ÇAGDAS et al. (2000) afirmaram que a presença de proteínas de massa molecular baixa são indicativas de funcionalidade renal; para HERVEY & SLATER (1967) a origem destas proteínas seria o fluido renal. Foram detectadas 30 bandas protéicas com massa molecular abaixo de 40kDa. Para considerar as bandas protéicas encontradas como indicadoras da maturidade renal, interpreta-se a IOD das bandas que estavam presentes em pelo menos metade mais um das amostras (16). Não se realizou correlação das bandas entre os líquidos, pois podem ser bandas protéicas de massa semelhante, mas eventualmente são bandas diferentes.

Das 30 bandas detectadas, 3 não estavam presentes no líquido amniótico (31; 19 e 9kDa), e uma no alantoideano (21kDa). A banda de massa molecular de 12kDa foi identificada em 38 das 40 amostras de líquido amniótico, sendo acompanhada das bandas 34 e 10kDa que estiverem presentes em 34 amostras. No líquido alantoideano a banda de massa 30kDa foi detectada em 32/40 amostras, e a de 32kDa em 29 amostras. A presença de bandas protéicas de mesma massa molecular em quase todas as amostras reforça as informações sobre a fisiologia fetal da espécie canina.

Observou-se que das 27 bandas detectadas no líquido amniótico, 10 estavam presentes em 24 amostras deste fluido fetal; enquanto das 29 bandas detectadas no alantoideano, 8 estavam presentes em mais de 20 amostras. Estas observações refletem a fisiologia e a atividade metabólica do concepto, a comunicação dos dois compartimentos com a circulação fetal e o processo de formação dos fluidos fetais. De acordo com MELLOR & SLATER (1974) a funcionalidade renal impõe sua marca na composição dos fluidos fetais, principalmente o alantoideano.

Algumas bandas só foram identificadas em amostra específicas, 36; 21 e 16 no líquido amniótico e 17 e 13kDa no alantoideano; esta singularidade pode ser atribuída a particularidade do feto visto que foram 5 fetos diferentes. Cada gel avaliado permitia a visualização das bandas de cada amostra com diferentes contrastes, assim uma melhor comparação reduzindo as possibilidades de erros na interpretação.

Segundo BELFORT & ORLANDI (1983) e KJELDSBERG & KNIGHT (1993) fetos humanos depositam excretas do aparelho urinário no compartimento amniótico. BONGSO et al. (1978) relataram que o feto bovino elimina urina no saco amniótico por volta de 76 e 164 dias utilizando o canal uretral, que posteriormente passaria para o saco alantoideano a partir dos 164 dias utilizando o úraco.

LUMBERS et al. (1985) afirmaram que no feto ovino entre 125 e 135 dias pós-concepção há metabólitos de origem renal e pulmonar. Em ovinos o fluxo de urina para a cavidade amniótica aumenta após 80 dias de gestação,

decrecendo gradativamente até 100 dias na cavidade alantoideana (BONGSO et al., 1978). De acordo com WILLIAMS et al. (1992) a excreção renal na espécie equina chega à cavidade alantoideana através do úraco.

A técnica utilizada para a dosagem de cortisol no líquido amniótico e alantoideano é de amplo conhecimento (RODBARD, 1974), para verificar a concentração deste esteróide nestes fluidos utilizou-se a metodologia descrita para soro sanguíneo. Os níveis de cortisol presentes nos fluidos fetais refletem a exposição a que o feto é submetido no ambiente uterino, e resultam da interação sutil entre fatores de origem materna e fetal. Os níveis de cortisol fetal em humanos até o meio da gestação não induz alterações na maturidade geral, porém até o final da gestação e próximo ao parto estes níveis aumentam gradativamente (BALLABH et al., 2002).

A concentração plasmática do cortisol em humanos se eleva próximo ao parto, sendo resultante da interação entre a adrenal fetal e o organismo materno (MOORE & PERSAUD, 1998). No presente experimento a concentração média do cortisol no líquido amniótico foi de $0,82 \pm 0,54 \mu\text{g/dL}$, e no alantoideano os valores apresentaram média de $1,55 \pm 0,69 \mu\text{g/dL}$, com $p < 0,05$. Segundo VERONESI et al. (2002) a secreção de cortisol fetal canino aumenta próximo ao parto em decorrência da maturação do eixo hipófise-adrenal, e reflete nos níveis deste esteróide no plasma materno. Estes autores observaram no momento do parto, níveis de cortisol plasmático considerado elevado ($90,4 \pm 41,9 \text{nmol/L}$), porém não houve pesquisa nos fluidos fetais.

OLSSON et al. (2003) observaram grandes variações nos níveis do cortisol sanguíneo das cadelas entre o início dos sinais de parto ($49 \pm 9 \text{nmol/L}^{-1}$) e o nascimento do primeiro filhote ($242 \pm 35 \text{nmol/L}^{-1}$) também creditando esta variação a presença do cortisol fetal.

O estresse oriundo do trabalho do parto aumenta a produção de cortisol que atua favorecendo o desenvolvimento normal do organismo e estimulando a maturação dos pulmões, intestinos, cérebro entre outros órgãos (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). O cortisol elevado também aumenta o metabolismo dos carboidratos produzindo a energia necessária para a

manutenção das funções vitais logo após o desprendimento da placenta (BELFORT & ORLANDI, 1983).

As concentrações de cortisol no líquido amniótico apresentaram correlação negativa com as diluições 0,9 ($r=-0,401$) e 0,8 ($r=-0,364$) do teste de Clements; e no líquido alantoideano foi constatado mesmo padrão ($r=-0,386$) e ($r=-0,339$) respectivamente. Quando se considerou a concentração de cortisol em relação as outras variáveis em avaliações intra-líquido, só foi observado correlação com a densidade óptica no líquido alantoideano ($r=0,314$).



Conclusões

7- CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados e nas condições deste estudo pode-se concluir que:

- ❖ O teste de Clements modificado favorece a análise de fluidos fetais caninos promovendo resultados confiáveis, onde as diluições (0,9; 0,8 e 0,7) espelham a viabilidade fetal e maturidade pulmonar.
- ❖ A análise celular com o Azul de Nilo (0,1%) promoveu a observação de células morfológicamente diferentes, com presença abundante de debris celulares. A diferença na relação entre células orangeofílicas e cianofílicas igual ou inferior a 10% reflete a maturidade pulmonar fetal canina sugerindo feto em estágio de pós-maturidade.
- ❖ Valor superior a 0,150 na análise da densidade óptica (DO) dos líquidos fetais de cães é indicativo de maturidade pulmonar.
- ❖ A banda de massa molecular de 66 kDa foi detectada em pelo menos um dos dois líquidos estudados em cada feto, podendo refletir a fisiologia fetal.
- ❖ Cinco bandas protéicas presentes nos dois fluidos podem espelhar a maturidade renal, pois foram detectadas em mais de 20 amostras (32; 30; 28; 20 e 12).
- ❖ A concentração de cortisol nos líquidos fetais reflete a exposição a que o feto canino é submetido no ambiente uterino.



Bibliografias

8- BIBLIOGRAFIAS

- AIDASANI, R., PIETERSE, M.E., VANDERWEYDEN, G.G., TAVERNE, M.A.M. Some metabolic constituents of caprine foetal fluids and foetal serum. **J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 335-6, 1992.
- ÁLVAREZ-NAVA, F., SOTO, M., PADRÓN, T., MORALES, A. VILLALOBOS, D., ATENCIO, A. R., PRIETRO, M., MARTÍNEZ, M. C. Cribado prenatal sérico materno para la detección da anormalidades cromossômicas fetales: importância clínica de la tasa de falsos positivos. **Invest. Clin.**, v. 44, n. 3, p. 195-207, 2003.
- BAETZ A. L.; CRANDELL S. E.; SCHMERR M. J.; BARNETT D.; BRYNER J. H. Plasma alpha-fetoprotein concentrations in pregnant cows exposed to *Sarcocystis cruzi*, *Campylobacter fetus* or *Aspergillus fumigatus*. **Am. J. Vet. Res.** v. 42, n. 12, p. 2146-8, 1981.
- BAETZ, L.L., HUBBERT, W.T., GRAHAM, C.K. Changes of biochemical constituents in bovine foetal fluids with gestational age. **Am. J. Vet. Res.**, v. 37, p. 1047-52, 1976.
- BALARAMAN V.; MEISTER J.; KU T. L. Lavage administration of dilute surfactants after acute lung injury in neonatal piglets. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. 12-7, 1998.
- BALLABH, P.; LO, E. S.; KUMARI, J.; COOPER, T. B.; ZERVOUDAKIS, M. A. I.; AULD, P. A. M.; KRAUSS, A. N.; Pharmacokinetics of betamethasone in twin and singleton pregnancy. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 71, p. 39-45, 2002.
- BARRETO, C. S. 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. Tese de Mestrado. FMVZ-UNESP-Campus de Botucatu, 2002, 138p.
- BARTHA, J. L.; ROMERO-CARMONA, R.; COMINO-DELGADO, R.; ARCE, F.; ARRABAL, J. Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid, *Obstet. Gynecol.*, v. 96, n. 4, p.588-92, 2000.
- BELFORT, P., ORLANDI, O.V. Placenta e Anexos In:_____ **Medicina Perinatal**. São Paulo: Manole, 1983, p. 14-51.

- BONGSO, T.A., BASRUR, P.K. Citology of bovine foetal fluids. **Can. J. Comp. Med.**, v. 41, p. 287-293, 1977.
- BONGSO, T. A.; WETTIMUNY, S. G. S.; EDIRISINGHE, R.; KUMARATILEKE, L. Determination of fetal sex in cattle by citologic examination of amniotic fluid. **Am. J. Vet. Res.**, v. 39, n. 9, p. 1545-6, 1978.
- BRADLEY, R.M., MISTRETTA, C.M. Swallowing in foetal sheep, **Science**, v. 179, p. 1016-7, 1973.
- BRANCO, E. R.; FERREIRA, G. J. B. C.; SAMOTO, V. Y.; MIGLINO, M. A. Aspectos bioquímicos de líquidos fetais de cães SRD (Cannis familiaris-Linaeus, 1758). In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005. Proceedings: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, CD-rom.
- CAMPANA, S. G.; CHÁVEZ, J. H.; HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico, **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 3, p. 215-8, 2003.
- ÇAGDAS, A; AYDINLI, K.; IREZ, T.; TEMIZYREK, K.; APAK, M. Evaluation of the fetal kidney maturation by assessment of amniotic fluid alpha-1 microglobulin levels, **European J. Obst. Gyn. Reprod. Biol.** v. 90, p 55-61, 2000.
- CHAPPUIS, G. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. **Vaccine**, v.16, n.14/15, p.1468-72, 1998.
- CLEMENTS J. F.; PLATZKER A. C. G.; TIENRNEY D. F. Assessment of the risk respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. **N. Engl. J. Med.** , v.286, p. 1077-81, 1972.
- CURLEY, A. E.; HALLIDAY, H. L. The present status of exogenous surfactant for the newborn. **Early Human Development** v.61, p. 67-83, 2001.
- DALENCE, C. R.; BOWIE, L. J.; DOHNAL, J. C.; FARRELL, E. E.; NEERHOF, M. G. Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. **Obstet. Gynecol.**, v. 86, n. 2, p. 235-9, 1995.
- DERUELLE, P.; HOUFFLIN-DEBARGE, V.; MAGNENANT, E.; JAILLARD, S.; RIOU, Y.; PUECH, F.; STORME, L., Effects of antenatal glucocorticoids on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.189, n. 1, p. 208-15, 2003.
- DÍAZ R. A. C., MILLO J. A. M., DOMÍNGUEZ N. C., Evaluación del surfacén em el síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, **Rev. Cubana Pediatr.**, v. 72, n. 4, p. 287-94, 2000a.

- DÍAZ R. A., DÍAZ M. V., MIRANDA M. E. P. Prematuridad extrema y uso materno de corticoides antenatal. **Rev. Cubana Pediatr.**, v. 72, n. 4, p. 281-86, 2000b.
- FREDDI N. A.; PROENÇA FILHO J. O.; FIORI H. H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno em pediatria. **J. Pediatr.**, v. 79 (supl. 2), p. S205-S212, 2003.
- GORDON, E. D.; FERRÁ, M. C. Registro, incidencia y diagnóstico prenatal de las malformaciones congénitas mayores más severas. **Rev. Cubana Med. Gen. Integr.**; v. 15, n. 4, p. 403-8, 1999.
- GORDON, E. D.; BRACERO, F. M.; VARGAS, M. L.; DÍAZ, O. C. Evaluación del programa de diagnóstico prenatal de las malformaciones congénitas por cuantificación de la alfafetoproteína. Camaguey 1985-1998. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v. 22, n. 1, p. 5-10, 2003.
- GULBIS, B.; GERVY, C.; JAUNIAUX, E. Amniotic fluid biochemistry in second-trimester trisomic pregnancies: relationships to fetal organ maturation and dysfunction. **Early Human Development**, v. 52, p.211-19, 1998.
- HAFEZ, E.S.E. Ciclos Estrais. In: ____ **Reprodução Animal**. 6Ed., São Paulo: Manole, 1995, 493p.
- HAU, J.; SVENDSEN, P.; TEISNER, B.; PEDERSON, G. T.; KRISTIANSEN, B. Correlation between fetal weight and maternal serum levels of murine α -fetoprotein and quantitation of four molecular forms. **Biol. Reprod.**, v. 24, p.683-9, 1981.
- HERVEY, E.J., SLATER, J.S. The source of sheep foetal fluids in the later stages of gestation. **J. Physiol.**, v. 22, p. 40-1, 1967.
- ISOHAMA, Y.; ROONEY, S. A. Glucocorticoid enhances the response of type II cells from newborn rats to surfactant secretagogues. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1531, p. 241-50, 2001.
- JOBÉ, A. Respiratory distress syndrome. New therapeutic approaches to a complex pathophysiology. **Adv. Pediatr.**, v. 30, p. 93, 1983.
- KJELDSBERG, C., KNIGHT, J. Body Fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serum e synovial fluids. In: ____ **American Society of Clinical Pathology**. Chicago: Theid ed, 1993, 387p.
- KOTERBA A. M., PARADIS M. R. Specific respiratory conditions. In: KOTERBA A. M., DRUMMOND W. H., KOSCH P. C. **Equine Clinical Neonatology**, Lea & Febiger: London, p. 177-89, 1990.

- KUCHENBECKER W. K., PISTORIUS L. R., PATTINSON R. C. The Tap test - an accurate first-line test for fetal lung maturity testing. **S. Afr. Med. J.**, v. 92, n. 9, p. 720-3, 2002.
- KUCUK M. Tap test, shake test and phosphatidylglycerol in the assessment of fetal pulmonary maturity. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 60, p. 9-14, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.
- LAI, P. C.; MEARS G. J.; VAN PETTEN G. R.; HAY D. M.; LORSCHIEDER F. L. Fetal-maternal distribution of ovine alpha-fetoprotein. **Am. J. Physiol.** v. 235, n. 1, p. E27-31, 1978.
- LINDQVIST, A.; AKERSTROM, B. Bovine alpha 1-microglobulin/bikunin. Isolation and characterization of liver cDNA and urinary alpha 1-microglobulin. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1306, n. 1, p. 98-106, 1996.
- LUMBERS, E.R., SMITH, F.G., STEVENS, A.D., Measurement of net transplacental transfer of fluid to the fetal sheep. **J. Physiol.**, v. 364, p. 289-99, 1985.
- MAESTRI, D., SANSAVERINO, M. T. V., CHEINQUER, N., CORREIA, M. C. M., KESSLER, R. G., AZEVEDO MAGALHÃES, J. A. Alfafetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 44, n. 4, p. 273-6, 1998.
- MARTÍNEZ V., JIMÉNEZ M., SCHOSINSKY K. Comparación de la determinación enzimática de fosfolípidos que contienen colina con troas pruebas para evaluar madurez pulmonar fetal. **Rev. Costarric. Cienc. Med.**, v.20, n.1-2, p. 51-65, 1999.
- MELLOR, D.J., SLATER, J.S. Some aspects of the physiology of sheep foetal fluids. **Br. Vet. J.**, v. 130, p. 238-48, 1974.
- MELLOR, D.J., SLATER, J.S., MATHERSON, C.I. Effects of changes in ambient temperature on maternal plasma and allantoic fluid from chronically catheterized ewes during the last two months of pregnancy. **Res. Vet. Sci.**, v. 18, p. 219-21, 1975.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Placenta e Membranas Fetais. In:____ **Embriologia Clínica**, 6 Ed., Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1998, 543p.

- MORRISON J.; WHYBREW W.; BUCOVAZ E. The L/S ratio and shake test in normal and abnormal pregnancies. **Obstet. Gynecol.** v. 52, p. 410-4, 1978.
- MOSS T. J., MULROONEY N. P., NITSOS I., IKEGAMI M., JOBE A. H., NEWNHAM J. P. Intra-amniotic corticosteróides for preterm lung maturation in sheep. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 189, n. 5, p. 1389-95, 2003a.
- MOSS, T. J. M.; DOHERTY, D. A.; NITSOS, I.; HARDING, R.; NEWNHAM, J. P. Pharmacokinetics of betamethasone after maternal or fetal intramuscular administration. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.189, n. 6, p. 1751-57, 2003b.
- NEWBY D.; DALGLIESH G.; LUALL F.; AITKEN D. A. Alphafetoprotein and alphafetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term. **Placenta**, v. 26, n. 2-3, p. 190-200, 2005.
- NEWNHAM, J. P.; MOSS, T. J. M.; KRAMER, B. W.; NITSOS, I.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H. The fetal maturational and inflammatory responses to different routes of endotoxin infusion in sheep. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.186, n. 5, p. 1062-8, 2002.
- NITSOS, I.; MOSS, T. J. M.; COCK, M. L.; HARDING, R.; NEWNHAM, J. P. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. **J. Soc. Gynecol. Investing.**, v.9, n. 2, p.80-5, 2002.
- NOMURA R. M. Y.; MIYADAHIRA S.; FRANCISCO R. P. V.; OKATANI D.; ZUGAIB M. Avaliação da maturidade fetal em gestações de alto risco: análise dos resultados de acordo com a idade gestacional. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 47, n. 4, p. 346-51, 2001.
- OLIVEIRA, F. R.; BARROS, E. G.; MAGALHÃES, J. A. Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 215-22, 2002.
- OLSSON, K.; BERGSTROM, A.; KINDAHL, H.; LAGERSTEDT, A. S. Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F₂alpha metabolic during labour in the dog. **Acta Physiol. Scand.**, v. 179, n. 3, p. 281-7, 2003.
- PIAZZE, J. J.; MARANGHI, L.; NIGRO, G.; RIZZO, G.; COSMI, E.; ANCESCHI, M. M. The effect of glucocorticoid therapy on fetal lung maturity indices in hypertensive pregnancies, **J. Perinat. Med**, v. 92, p. 220-5, 1998.

- PIAZZE, J. J.; MARANGHI, L.; CEREKJA, A; MELONI, P.; GIOIA, S.; FUMIAN, L.; COSMI, E. V.; ANCESCHI, M. M. Amniotic fluid lamellar body counts for the determination of fetal lung maturity: an update. **J. Perinat. Med.**, v. 33, n. 2, p. 156-60, 2005.
- PENDERS, J.; DELANGHE, J. R. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications, **Clinic. Chim. Acta**, v. 346, p. 107-118, 2004.
- PRADO, V. F.; REIS, D. D' A.; PENA, S. D. J. Biochemical and immunochemical identification of the fetal polypeptides of human amniotic fluid during the second trimester of pregnancy. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 23, p. 121-31, 1990.
- PRESTES, N. C.; CHALLOUB, M. D.; LOPES, M. D.; TAKAHIRA, R. K. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. **Small Ruminant Res.**, v.39, p. 277-81, 2001.
- REBELLO C. M., PROENÇA R. S. M., TROSTER E. J., JOBE, A. H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno-o que é estabelecido e o que necessitamos determinar. **J. Pediatria**, v. 78 (supl. 2), p. S215-S226, 2002.
- REDDY, A. P.; REDDY, V. S. C.; RAO, A. S.; SHARMA, G. P.; REDDY, G. V. N.; REDDY, T. J.; REDDY, V.S. Biochemical studies in the ewe (ovis aries) amniotic fluid during different phases of gestation. **Int. J. Anim. Sci.**, v. 10, p. 321-3, 1995.
- ROBERTS, S.J. Gestational period, embriology. In:____**Veterinary Obstetrics and Genital Diseases**. 2: ed. Michigan: Edwards Brothers, 1971, p. 36-46.
- RODBARD, D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. **Clinical Chemichs**, n. 20, p. 1255-1270, 1974.
- RODRIGUEZ-MACIAS K.A. A comparison on three test for determining fetal pulmonary maturity. **Inter. J. Gynecol. Obstetr.**, v. 51, p. 39-42, 1995.
- SALAS, L. S. H.; CORRALES, R. A.; CRESPO, G. H.; ALESSANDRINI, G. E. A. Genética comunitária: resultados em Mantua, 1998-1999, **Rev. Cubana Enfermer.**, v. 18, n. 1, p. 50-4, 2002.
- SEPULVEDA, W., DONALDSON, A., JONSON, R. D., DAVIES, G., FISK, N. M. Are routine alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase determinations still

- necessary at second-trimester amniocentesis? Impact of high-resolution ultrasonography. **Obstet. Gynecol.** v. 83, n. 1, p. 107-112, 1995.
- SMITH K. M.; LAI P. C.; ROBERTSON H. A.; CRURCH R. B.; LORSCHIEDER F. L. Distribution of alpha 1-fetoprotein in fetal plasma, allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of cows. **J. Reprod. Fertil.** v. 57, n. 1, p. 235-8, 1979.
- SOCOL M. L., The Tap Test: confirmation of a simple, rapid, inexpensive, and reliable indicator of fetal pulmonary maturity. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 162, n. 1, p. 218-222, 1990.
- SOUZA, H. E. M.; CARDOSO, E. C.; BARNABÉ, V. H.; VALE, W. G. Alterações bioquímicas dos líquidos fetais de bubalinos com o avanço da gestação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 23, n. 3, p. 178-9, 1999.
- SUN B.; CURSTED T.; SONG G. W.; ROBERTSON B. Surfactant improves lung function and morphology in newborn rabbits with meconium aspiration. **Biol. Neonate**, v. 63, p. 96-104, 1993.
- VELDHUIZEN, E. J. A.; HAAGSMAN, H. P. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics, **Bioch. Biophys Acta**, v. 1467, p. 255-70, 2000.
- VERONESI M. C., BATTOCCHIO M., MARINELLI L., FAUSTINI M., KINDAHL H., CAIROLI F. Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F_{2α} of the periparturient bitch. **J. Vet. Med.**, v. 49, p. 264-8, 2002.
- YAMADA, T.; KAKINOKI, M.; TOTSUKA, K.; ASHIDA, Y.; NISHIZONO, K.; TSUCHIYA, R.; KOBAYASHI, K. Purification of canine alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein values in dogs, **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 47, p. 25-33, 1995.



Anexos

9- ANEXOS

Anexo I - Soluções Utilizadas na Corrida Eletroforética

Tampão de separação (4x)

TRIS-HCl 2 M pH 8,8

24,2 g TRIS

50 mL Água Milli Q

Ajustar pH 8,8 com HCl 2N ($\pm 4,0$ mL), completar até 100 mL com água MilliQ

Estocar durante 3 meses à 4°C em vidro âmbar

Tampão de empilhamento (4x) – TRIS-HCl 1 M pH 6,8

6,05 g TRIS

25 mL Água MilliQ

Ajustar pH 8,8 com HCl 2N ($\pm 8,0$ mL), completar até 50 mL com água MilliQ

Estocar durante 3 meses à 4°C em vidro âmbar

SDS 10%

10 g SDS

Completar até 100 mL com água MilliQ, válido por 6 meses à temperatura ambiente

Tampão de corrida (5x)

15 g TRIS

72 g Glicina

5,0 g SDS

Completar até 1 litro com água MilliQ, pH deve ser de aproximadamente 8,3.

Estocar à 4° C (estável por tempo indefinido à temperatura ambiente).

Tampão da amostra (5x)

3,1 mL TRIS-HCl 1 M pH 6,8

5,0 mL Glicerol 50%

2,0 mL SDS 10%

1,0 mL Bromofenol azul 1%

0,9 mL Água MilliQ

Estável por meses à -20° C, pode ser preparado sem o Bromofenol azul

Glicerol 50%

5,0 mL Glicerol 100%

5,0 mL Água MilliQ

Estocar à temperatura ambiente

Soluções Trabalho**Solução A** (Acrilamida (30 %)/Bisacrilamida (0,8 %))

29,2 g Acrilamida

0,8 g Bisacrilamida

Completar até 100 mL com água MilliQ, manter sob refrigeração em frasco âmbar

Solução B

75 mL TRIS-HCl 2 M pH 8,8

4 mL SDS 10%

21 mL água MilliQ

Estável por meses no refrigerador

Solução C

50 mL TRIS-HCl 1M pH 6,8

4 mL SDS 10 %

46 mL água MilliQ

Estável por meses no refrigerador

Persulfato de Amônia 10 %

0,5 g Persulfato de amônia

Completar até 5,0 mL com água MilliQ

Estável por meses em tubo tampado à -20°C

Tampão de corrida

100 mL Tampão de corrida

400 mL Água MilliQ

Tampão da amostra

40 µL Amostra

10 µL Tampão da amostra (5 X)

Adicionar 1 parte de tampão para 4 partes de amostra

TABELA 1- Gel de Separação 12%

Soluções	Volumes
Solução A	6,0 mL
Solução B	3,75 mL
Água MilliQ	5,25 mL
Persulfato de Amônia 10%*	100 µL
TEMED ⁷	10 µL
Volume Total	15 mL

TABELA 2- Gel de Empilhamento 5 %

Soluções	Volumes
Solução A	0,67 mL
Solução C	1,0 mL
Água MilliQ	2,3 mL
Persulfato de Amônia 10%*	30 µL
TEMED	5 µL
Volume Total	4,0 mL

⁷ TEMED - Amersham Pharmacia Biotech

Anexo II

Coloração Coomassie Azul Brilhante R-250 e Nitrato de Prata

COLORAÇÃO DE COOMASIE AZUL BRILHANTE R-250

Solução Corante

1,0 g Coomassie Azul Brilhante R-250
450 mL Metanol
450 mL Água MilliQ
100 mL Ácido acético glacial
Estável por meses em temperatura ambiente

Solução Descorante

100 mL Metanol
100 mL Ácido acético glacial
800 mL Água MilliQ
Estável por meses em temperatura ambiente

Procedimento da Coloração

Transferir o gel para um recipiente plástico ou de vidro, utilizando um jato de água destilada a fim de desprender o gel da placa de vidro. Adicionar pequena quantidade de solução corante, de modo que cubra todo o gel.

Aquecer em forno de microondas por 20 a 30 segundos (45°C), agitar por 30 minutos.

Retirar a solução corante (pode ser reutilizada por mais 2 ou 3 vezes) e lavar o gel com água destilada.

Adicionar solução descorante de modo que cubra todo o gel.

Aquecer em forno de microondas por 20 a 30 segundos (45°), agitar por 15 minutos.

Trocar a solução descorante, aquecer e agitar novamente por mais 15 minutos.

Lavar o gel em água destilada.

Transferir o gel para um recipiente grande e adicionar água destilada (em torno de 20 a 30 vezes o volume do gel).

Aquecer em forno de microondas por 20 minutos na potência 7 (ou 70).
Retirar a metade da água adicionada e completar com mais água destilada não aquecida.

Aquecer novamente em forno de microondas por mais 10 minutos.

COLORAÇÃO DE NITRATO DE PRATA

Solução de Nitrato de Prata

2,0 g Nitrato de prata

2,5 mL Água Milli Q

Armazenar em frasco âmbar, no refrigerador.

Solução de Hidróxido de Sódio

5,29 g NaOH anidro

100 mL Água Milli Q

Armazenar em frasco âmbar

Solução de Citrato de Sódio Monohidratado à 2,5 %

1,25 g Citrato H₂O (para Citrato 2H₂O usar 1,33g)

50 mL Água Milli Q

Armazenar no refrigerador (4° C)

Solução para Coloração

0,5 mL Solução nitrato de prata

0,5 mL Solução hidróxido de sódio

0,5 mL Hidróxido de amônio concentrado

50 mL Água Milli Q

Acrescentar a solução de nitrato de prata por último e lentamente (gota a gota enquanto se agita). Caso a solução se torne marrom, acrescentar imediatamente hidróxido de amônio concentrado.

Preparar a solução em vidro recoberto por papel alumínio

Solução para Revelação

0,5 mL Solução citrato 2,5 %

0,125 mL Formaldeído 37 %

250 mL Água MilliQ

Solução para Interromper a Reação

45 mL Metanol

10 mL Ácido acético glacial

45 mL Água Milli Q

Armazenar em temperatura ambiente

Solução de Formaldeído à 0,037 %

200 µl Formaldeído 37 %

200 mL Água Milli Q.

Procedimento da Coloração

Transferir o gel para um recipiente plástico ou de vidro, utilizando um jato de água destilada a fim de desprender o gel da placa de vidro.

Fixação em metanol 50% por pelo menos 1 hora.

Após este período reidratação em água destilada contendo formaldeído a 0,037 % por 20 minutos

Lavar o gel em água destilada por 20 minutos, com duas trocas de água.

Incubar na solução de coloração por 15 a 20 minutos, mantendo sob constante agitação.

Proceder então a lavagem do gel com 4 a 6 trocas de água destilada e depois em água corrente por 15 minutos (agitador).

Retirar a água e acrescentar a solução para revelação.

As bandas de proteína apareceram dentro de 5 a 10 minutos, ou antes.

Para terminar a reação, retirar a solução de revelação e adicionar a solução para interromper a reação.