

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**MATURIDADE PULMONAR E FETAL DE BEZERROS DA RAÇA
HOLANDESA PRETA E BRANCA RECÉM-NASCIDOS, A TERMO
E HÍGIDOS: ANÁLISE DO LÍQUIDO AMNIÓTICO**

GABRIELA NASCIMENTO DANTAS

Botucatu-SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**MATURIDADE PULMONAR E FETAL DE BEZERROS DA RAÇA
HOLANDESA PRETA E BRANCA RECÉM-NASCIDOS, A TERMO
E HÍGIDOS: ANÁLISE DO LÍQUIDO AMNIÓTICO**

GABRIELA NASCIMENTO DANTAS

*Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.*

Orientador: Professor Adjunto Roberto
Calderon Gonçalves (FMVZ/UNESP).

Co-Orientador: Professor Titular Fernando
José Benesi (FMVZ/USP).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dantas, Gabriela Nascimento.

Maturidade pulmonar e fetal de bezerros da raça holandesa preta e branca : análise do líquido amniótico / Gabriela Nascimento Dantas. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Coorientador: Fernando José Benesi

Capes: 50501003

1. Bovino - Doenças. 2. Síndrome do desconforto respiratório. 3. Líquido amniótico - Exame. 4. Neonatologia veterinária. 5. Nascimento a termo.

Palavras-chave: Anexos fetais; Bovinos; Neonatologia; SAR; Síndrome da Angústia Respiratória.

Gabriela Nascimento Dantas

MATURIDADE PULMONAR E FETAL DE BEZERROS DA RAÇA
HOLANDESA PRETA E BRANCA RECÉM-NASCIDOS, A TERMO E
HÍGIDOS: ANÁLISE DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Adjunto Roberto Calderon Gonçalves

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

Professor Assistente Doutor Simone Biagio Chiacchio

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP - Botucatu-SP.

Professor Associado Ivan Roque de Barros Filho

Membro

Departamento de Medicina Veterinária – UFPR – Curitiba-PR.

Data da Defesa: 23 de fevereiro de 2015.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por sua proteção e presença constante em minha vida.

Aos animais, únicos seres ainda capazes de surpreender o homem e fazê-lo analisar sua conduta perante a vida, sendo fonte eterna de conhecimento e inspiração. Um agradecimento especial deve ser feito a todos os bezerros (e suas respectivas mães) que participaram desta Pesquisa, e ao Fred, meu anjinho de quatro patas.

À minha família querida, que é o meu porto seguro. Aos meus pais, Rogério Dantas e Leda Dantas, que estiveram ao meu lado em todas as adversidades, me ensinando, me motivando e me amparando sempre. Se não fosse por vocês eu certamente não chegaria até aqui hoje. À minha irmã Thaís Dantas que muito me auxiliou com sua amizade, atenção e carinho. Eu amo vocês de todo o meu ser.

Ao meu orientador, Professor Roberto Calderon Gonçalves, não somente pelos diversos ensinamentos e confiança depositados em mim e em meu trabalho, mas também pela amizade compartilhada durante a Residência e o Mestrado.

Ao meu co-orientador, Professor Fernando José Benesi, por estar sempre disposto a me oferecer valiosos conselhos. Desde a graduação o senhor é um grande incentivador na minha busca pelo conhecimento, e serei eternamente grata por isso.

Ao meu namorado e amigo, Vitor Hugo dos Santos, agradeço pelo apoio em todos os momentos nesses últimos dois anos. Seu companheirismo diário me confortou e me deu coragem e ânimo para obter sucesso nessa jornada. Eu amo você.

Às minhas amigas Bianca Paola Santarosa e Marina Gonzales de Carvalho, que encararam comigo noites em claro, dias intermináveis de observação de partos e colheitas de amostras nos horários mais impróprios, durante a fase experimental do projeto. Não posso deixar de agradecer também pela amizade e por estarem ao meu lado nesta etapa de nossas vidas.

Aos amigos que fiz em Botucatu, que me acolheram tão bem e proporcionaram um convívio harmonioso e troca de experiências pessoais e profissionais. Só tenho a agradecer pelos incontáveis momentos felizes.

À Fazenda Agrindus (Descalvado/SP), onde foi realizada a fase experimental deste trabalho, e à Fazenda Real (Cabrália Paulista/SP), onde foram feitos os testes preliminares, os meus sinceros agradecimentos por cederem gentilmente seus animais para este estudo.

Ao Laboratório Clínico da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, em especial ao técnico de laboratório Marcos Aurélio de Oliveira, pelo treinamento com a análise do líquido amniótico.

À minha amiga e patologista veterinária Maria Claudia Lopes da Silva, pela ajuda com a técnica de Hematoxilina-Shorr.

Ao Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu pelo auxílio com o processamento e análise das amostras de líquido amniótico em busca dos corpos lamelares: obrigada por persistirem comigo.

Ao Professor José Carlos Pantoja pela supervisão dos meus cálculos estatísticos.

Aos professores da Clínica de Grandes Animais desta Faculdade pelo conhecimento compartilhado e pelo apoio desde a época da Residência.

Aos Professores José Paes de Oliveira Filho e Maria Lúcia Gomes Lourenço pelas inestimáveis contribuições feitas ao meu trabalho através das discussões geradas por ocasião do Exame de Qualificação.

Aos Professores Simone Biaggio Chiacchio e Ivan Roque de Barros Filho, membros da Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, por sua preciosa correção da minha Dissertação.

Ao Departamento de Clínica Veterinária e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, que me receberam de portas abertas e me proporcionaram a oportunidade de grandes aprendizados e experiências.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Estudos concedida, que me permitiu dedicação exclusiva à Pós Graduação e a realização deste trabalho.

E a todos que, direta e indiretamente, fizeram parte desta história.

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1	Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para amplitude respiratória e comprimento de coluna de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento.....
	28
Tabela 2	Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento.....
	31
Tabela 3	Resultado da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), média, intervalo de confiança (IC 95%), erro padrão (EP), desvio padrão (DP), valor mínimo (Mín) e máximo (Máx) para o pH sanguíneo de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento: pH geral, pH dos animais nascidos por eutocia e pH dos animais nascidos por distocia.....
	33
Tabela 4	Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para células azuis e células alaranjadas obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos momento do parto, por meio da coloração com Azul de Nilo.....
	38

Tabela 5	Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para células azuis e células alaranjadas obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio da coloração Hematoxilina-Shorr.....	39
Tabela 6	Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para proporções entre células alaranjadas e azuis (L:A) obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio das colorações com Azul de Nilo e Hematoxilina-Shorr.....	40

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	A) Microscopia eletrônica evidenciando corpo lamelar em líquido amniótico da espécie equina (CASTAGNETTI et al., 2007); B) Microscopia eletrônica de corpo lamelar humano inserido em parênquima pulmonar (WONG et al., 1998); C) Microscopia eletrônica de corpo lamelar de rato em parênquima pulmonar (STAHLMAN et al., 2000); D) Microscopia eletrônica de corpo lamelar de ovino em líquido amniótico (SOUZA, 2014).....	14
Figura 2	Fotomicrografias de corpos lamelares da espécie bovina presentes em líquido amniótico obtido no momento do parto através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão....	37
Figura 3	Morfologia de célula acidofílica (célula azul) obtida por meio de microscopia óptica da citologia do líquido amniótico corado com Azul de Nilo.....	39
Figura 4	Morfologia de célula orangiofílica (célula alaranjada) obtida por meio de microscopia óptica da citologia do líquido amniótico corado com Hematoxilina-Shorr.....	40

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	04
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 Síndrome da Angústia Respiratória (SAR).....	06
2.2 Líquido Amniótico: Função e Composição.....	09
2.3 Citologia do Líquido Amniótico.....	10
2.4 Contagem de Corpos Lamelares.....	11
2.5 Teste de Clements.....	14
3 OBJETIVO.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais.....	17
4.2 Coleta do líquido amniótico.....	20
4.3 Análise do líquido amniótico.....	20
4.4 Análise Estatística.....	24
4.5 Aspectos Éticos.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 O Neonato.....	26
5.1.1 Tipo de Parto.....	26
5.1.2 Amplitude Respiratória e Comprimento de Coluna do Bezerro.....	27
5.1.3 Exame Físico.....	29
5.1.4 Resultados do Escore Apgar.....	32
5.1.5 pH venoso.....	32
5.2 Resultados obtidos com a Análise do Líquido Amniótico.....	34
5.2.1 Coloração e Aspecto.....	34
5.2.2 Teste de Clements.....	35
5.2.3 Corpos Lamelares.....	36

5.2.4	Resultados das Citologias.....	38
6	CONCLUSÕES.....	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
9	ARTIGO CIENTÍFICO.....	51
	ANEXOS.....	63

DANTAS, G.N. **Maturidade pulmonar e fetal de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca recém-nascidos, a termo e hígidos: análise do líquido amniótico**. Botucatu, 2015. 67p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Considerando a representatividade da bovinocultura de leite em nosso país, a preocupação com índices de mortalidade dos animais torna-se cada vez maior. No que se refere à mortalidade em bezerros, a Síndrome de Angústia Respiratória (SAR) tem importante relevância no período perinatal, sendo causada pela inadequada produção do surfactante no pulmão imaturo. Animais advindos de técnicas como fertilização *in vitro* e clonagem são acometidos pela SAR com maior frequência, assim como neonatos prematuros. O líquido amniótico encontra-se em contato íntimo com o feto, podendo fornecer indícios de sua maturidade. O objetivo deste estudo foi padronizar as características do líquido amniótico - coloração, aspecto, viscosidade, avaliação dos corpos lamelares e do surfactante presente pelo teste de Clements e citologia - de bezerros nascidos a termo, maduros, hígidos e com vitalidade comprovadas por score Apgar, exame físico geral e medidas de coluna, amplitude respiratória (expansão torácica) e pH sanguíneo. Para tal finalidade, foram utilizados 50 bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, cujas mães tiveram o parto acompanhado para colheita do líquido amniótico por punção no momento da exposição da bolsa fetal no canal vaginal. O líquido amniótico apresentou coloração clara e com turvação decorrente de variados graus de viscosidade e presença ou ausência de grumos. O teste de Clements foi adaptado à espécie bovina por meio de modificação caracterizada pela adição de 3mL de líquido amniótico em 1mL de etanol 95%. A metodologia de contagem de corpos lamelares no contador de partículas automático (hematológico) não foi aplicável à espécie bovina devido ao pequeno tamanho do corpo lamelar, que apresentou diâmetro aproximado de 130nm. O teste do Azul de Nilo não foi satisfatório para prever a maturidade fetal na espécie bovina, diferentemente da citologia usando a coloração de Hematoxilina–Shorr, que se mostrou eficiente para a contagem das células orangiofílicas, que atingem grande

proporção no final da gestação. Medidas do comprimento de coluna e da amplitude torácica são úteis para o clínico que deseja avaliar a maturidade fetal, dentro de um conjunto de ferramentas utilizadas com esta finalidade. O presente trabalho estabeleceu novos parâmetros de avaliação da maturidade fetal e pulmonar para a espécie bovina, porém são necessários mais estudos para que os conhecimentos sobre o amadurecimento fetal no âmbito da Medicina Veterinária evoluam a patamares semelhantes aos da Medicina.

Palavras-chave: bovinos; neonatos; anexos fetais; Síndrome da Angústia Respiratória.

DANTAS, G.N. **Fetal and lung maturity in Holstein newborns: amniotic fluids analysis**. Botucatu, 2015. 67p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Considering the representativeness of dairy cattle in our country, the concern about the mortality rates of the animals increases each time. Regarding to calf mortality, the Respiratory Distress Syndrome (RDS) has an important relevance during the neonatal period, and it is present in immature lungs. The amniotic fluid is in direct contact with the fetus, and it is able to offer evidence about his maturity. The aim of this study was to standardize the characteristics of the amniotic fluid – color, aspect, viscosity, lamellar body and presence of surfactant evaluation by the Clements test and cytology – of term-born, mature, healthy calves and with proved vitality by the Apgar score, general physical exam and measurement of the spinal column and respiratory amplitude (thoracic expansion). There were used 50 Black and White Holstein calves, which mothers were observed at calving in order to collect the amniotic fluid by puncture in the moment of exposure of the fetal membrane through the vaginal canal. The amniotic fluid had a clear color and it was hazy because of the different degrees of viscosity and the presence or absence of clots. The Clements test could be adapted to the bovine species by the modification consisting in the addition of 3mL of amniotic fluid and 1mL of 95% ethanol. The methodology of the lamellar body count by the automated particle counter is not applicable for the bovine because of the small size of their lamellar body. The Nile Blue staining is unsatisfactory on predicting fetal maturity on the bovine species, different from cytology using Hematoxylin-Shorr stain. The cell stained orange counting, cells which are found in great amounts at the end of pregnancy. Measurements of the spine and thoracic amplitude are useful for the clinician who wants to evaluate fetal maturity, within a set of tools used with this purpose. The present study established new parameters for evaluation of fetal and pulmonary maturity in the bovine species.

Keywords: cattle; calf; fetal membranes; Respiratory Distress Syndrome.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cadeia produtiva do leite e seus derivados desempenha relevante papel no desenvolvimento econômico brasileiro, sendo responsável pelo suprimento de alimentos e geração de empregos e renda para a população. O leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes do agronegócio do Brasil (BARBOSA et al., 2009). Dados da Embrapa Gado de Leite demonstram que o país mantinha, em 2011, um efetivo de aproximadamente 23 milhões de vacas ordenhadas, ocupando o quarto lugar em produção de leite no mundo e somando anualmente 33,7 bilhões de litros produzidos, sendo o primeiro lugar ocupado pelos Estados Unidos, que tem produção de aproximadamente 80 bilhões de litros de leite por ano (SEBRAE, 2014).

Considerando a representatividade da bovinocultura de leite em nosso país, a preocupação com índices de mortalidade dos animais torna-se cada vez maior. No que se refere à mortalidade em bezerros, a síndrome de angústia respiratória (SAR) tem importante relevância no período perinatal (EIGENMANN et al., 1984), porém não há, em literatura, dados de sua incidência nesta espécie. A SAR, definida como insuficiência respiratória progressiva, é causada por inadequada produção ou função do surfactante. A enfermidade já foi descrita em neonatos prematuros das espécies ovina, suína, bovina e equina (BENESI, 1993; VAALA e HOUSE, 2006).

Em geral, a maturação do pulmão ao nascimento coincide com a maturidade do feto apresentando direta relação com a produção de surfactante (EIGENMANN et al., 1984). A função do surfactante é reduzir a tensão superficial na interface ar-líquido dos alvéolos, prevenindo seu colapso e facilitando o trabalho respiratório do recém-nascido, além de evitar o edema pulmonar (REBELLO et al., 1996). Na última década foram realizados estudos para esclarecer a importância do surfactante na maturação dos pulmões e a eficácia de testes para a determinação do estágio de desenvolvimento pulmonar, porém grande parte deles com aplicação à espécie humana (NOMURA et al., 2001; LUZ et al., 2003; GIL et al., 2010). Pesquisas com este escopo são escassas na Medicina Veterinária (TOQUETTI et al., 2009).

O líquido amniótico é importante componente do ambiente intrauterino e fornece inúmeras informações sobre a saúde e maturação do feto por estar em contato direto com seu trato respiratório e pele, refletindo assim a quantidade de surfactante presente e o tipo celular predominante no epitélio do feto (TABORDA et al., 2000; COSTA et al., 2001). Desta maneira, a maturidade pulmonar pode ser determinada por testes que avaliam amostras de líquido amniótico. Na Medicina, o teste de Clements (CLEMENTS et al., 1972) e a contagem dos corpos lamelares, respectivamente, exames qualitativo e quantitativo, são exemplos de testes simples, baratos, rápidos e bem padronizados que podem ser realizados em amostras de líquido amniótico para prever o grau de maturação dos pulmões do neonato (TABORDA et al., 2000; COSTA et al., 2001).

O teste ideal para avaliar a maturidade pulmonar fetal é aquele de fácil execução, com custos mínimos, que exige equipamentos simples, é rapidamente reproduzível e clinicamente confiável (FIELD et al., 1997).

Desta forma, este trabalho visou contribuir para a validação e o aperfeiçoamento de técnicas de mensuração do grau de maturidade pulmonar na Medicina Veterinária, priorizando testes de aplicação prática na rotina clínica. Assim, um estudo que padronize as características do líquido amniótico de bezerros maduros proporcionará a oportunidade de tratamento precoce dos animais prematuros, evitando prejuízos econômicos ao criador, principalmente no que se refere aos animais de alto valor genético, produtos de fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem. Além disso, entender e padronizar indicadores da maturação pulmonar fisiológica por meio dos testes de diagnósticos supracitados contribuirá para o entendimento da patogênese da SAR na espécie bovina, pré-requisito necessário para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas que amenizem ou previnam lesões pulmonares e a morte de animais em consequência da síndrome.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Síndrome da Angústia Respiratória (SAR)

A taxa de mortalidade perinatal pode ser definida como a porcentagem de bezerros que morrem durante o parto ou até 48 horas após o nascimento (BLEUL, 2009). Já Roy (1990) considera mortalidade perinatal como os óbitos ocorridos na última semana de gestação até o fim das primeiras 24 horas de vida. Porém a primeira definição é a mais utilizada na literatura. Johanson e Berger (2003) obtiveram, em seu estudo, a porcentagem de 7,1% de mortalidade perinatal, e Vaala e House (2006) relataram percentual entre 5 e 10%, em países norte-americanos.

Grande parte dos avanços ocorridos com relação à assistência neonatal veterinária nas últimas décadas relaciona-se com a função respiratória, visto que a capacidade funcional pulmonar é imprescindível para a adaptação e sobrevivência do neonato, ressaltando que os problemas respiratórios, dentre eles a SAR, são as principais causas de mortalidade perinatal na espécie bovina (MEE, 2008; BLEUL, 2009).

A SAR apresenta-se como um quadro de insuficiência respiratória progressiva, onde a deficiência na quantidade de surfactante pulmonar produzida, juntamente com pulmão e caixa torácica estruturalmente imaturos, desencadeia processo que evolui, após o nascimento, para dificuldade ventilatória (WHITSETT et al., 1999). O surfactante pulmonar é fundamental para a ventilação adequada, pois reduz a tensão superficial dos alvéolos. Ele consiste numa mistura composta por aproximadamente 80% de fosfolipídeos (principalmente dipalmitoil-fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol), 10% de proteínas (Proteínas Surfactantes A, B, C e D) e 10% de lipídios neutros (VAALA; HOUSE, 2006; LOBATO, 2011).

Conforme mencionado anteriormente, a ação do surfactante ocorre nas porções terminais do trato respiratório, ou seja, nos alvéolos, estruturas saculares recobertas de células epiteliais (pneumócitos tipo I) interpostas por células cubóides (pneumócitos tipo II) que, juntamente com a membrana basal

e o endotélio capilar, formam a barreira seletiva ar-sangue dos pulmões. Os pneumócitos do tipo II produzem os corpos lamelares (CL), que carregam o surfactante em seu interior e, uma vez excitados, desenrolam-se para tomar a forma de mielina tubular, responsável pela diminuição da tensão superficial dos alvéolos (KLEIN et al., 2014).

O alvéolo é uma estrutura instável devido a uma fina camada líquida presente em sua superfície, que gera uma tensão superficial inversamente proporcional ao diâmetro alveolar, e é neste ponto que a ação do surfactante se faz essencial. Suas moléculas interpõem-se entre as moléculas de água localizadas logo abaixo da superfície alveolar. Esta interposição interfere nas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água, e, desta maneira, a tensão superficial diminui (OBLADEN, 2005). Quando os alvéolos tem seu volume reduzido ao final da expiração, o surfactante fica mais concentrado na superfície e a atração entre as moléculas da água diminui, a tal ponto que a tensão superficial aproxima-se de zero, evitando, assim, o colapamento do alvéolo. O inverso ocorre no final da inspiração, quando a tensão superficial aumenta devido distância entre as moléculas de surfactante, e colabora diretamente com o início do processo de expiração passiva (KLEIN et al., 2014).

Assim, a ausência do surfactante leva ao quadro de colapso alveolar, com extravasamento de proteínas séricas para dentro do alvéolo, as quais inibem ainda mais a produção e a função do surfactante, lesando o epitélio responsável por sua produção e pelas trocas gasosas. Deste modo, estabelece-se um círculo vicioso que culmina em falência respiratória (WHITSETT et al., 1999). Assim, pode-se concluir que o surfactante é capaz de diminuir de maneira eficaz a tensão superficial alveolar e facilitar o trabalho respiratório do neonato, evitando a SAR e auxiliando na adaptação à vida extrauterina.

A primeira descrição da SAR data de 1959, quando Avery e Mead sugeriram que a causa da doença seria a ausência da produção do surfactante causada pela imaturidade dos pneumócitos do tipo II. A maturação do pulmão envolve não apenas o estabelecimento funcional do sistema surfactante, mas também o adelgaçamento da barreira capilar-alveolar, para que se efetuem as

trocas gasosas, a diminuição na permeabilidade alveolar-epitelial, e a maturação da parede torácica, que se torna mais complacente nas fases terminais da gestação (JOBE et al., 1983). Assim, um animal com SAR apresenta também essas disfunções, que, em conjunto, culminam no óbito do neonato por lesões pulmonares intensas (membranas hialinas, edema intersticial e alveolar), desequilíbrio ácido-base devido à hipoxemia com acidose consequente e hemorragias intracranianas (EIGENMANN et al., 1984).

Autores como Taborda et al. (1998) e Lobato (2011) propuseram que evitar o nascimento prematuro constitui a principal medida preventiva para reduzir os riscos e sequelas da morbidade respiratória neonatal, fato que ficou evidente após o estudo de Toquetti et al. (2009), no qual os autores determinaram em qual período gestacional o feto bovino começa a apresentar células produtoras de surfactante. Ao trabalhar com animais advindos de frigorífico, Toquetti et al. (2009) mostraram que essa produção iniciava-se no sétimo mês da prenhez, mas que apenas recém-nascidos a termo possuíam pulmão em fase alveolar terminal, indicando que mesmo com a presença dos pneumócitos tipo II no sétimo mês gestacional, o animal precisaria passar pelos estágios finais de maturação nos dois meses intrauterinos subsequentes, até mesmo para haver a progressão da maturação dos outros sistemas orgânicos. Assim, animais que não passam por todas as etapas de amadurecimento são predispostos ao desenvolvimento da SAR.

Não foram encontrados dados na literatura sobre a incidência de SAR na espécie bovina, porém Birgel Junior et al. (2011) citaram que bezerros oriundos da técnica de clonagem apresentam grande incidência de quadros de asfixia (SAR) que levam o neonato ao óbito, mas que podem ser minimizados com a aplicação de surfactante intratraqueal, evidenciando, com o diagnóstico terapêutico, a etiologia da doença.

Nos Estados Unidos, a SAR é a quarta causa mais comum de morte neonatal em bebês (BLEUL, 2009). A maioria das crianças afetadas consiste em neonatos prematuros, nascidos antes de 35 semanas de gestação, sendo que, na mulher, a gestação dura em média 40 semanas. Da mesma forma, o risco desta doença é mais elevado nos bezerros prematuros, especialmente naqueles que nascem antes de 260 ou 270 dias de gestação, conforme a raça

tenha origem taurina ou zebuína, respectivamente (BLEUL, 2009; FEITOSA e BENESI, 2014). Devido às suas características, a SAR em bezerros parece ser semelhante àquela encontrada no recém-nascido humano (EIGENMANN et al., 1984).

2.2. Líquido Amniótico: Função e Composição

O líquido amniótico (LA) provém dos organismos materno e fetal, em proporções variáveis, de acordo com a idade gestacional (MIES FILHO, 1987). Seus principais componentes estão em suspensão ou em dissolução. Entre os elementos em suspensão encontram-se células esfoliadas do âmnio, assim como restos de pelos, escamação cutânea do feto (importantes para fins de avaliação de maturidade fetal) e gotículas de gordura (BELFORT e ORLAND, 1993). Nos fetos em sofrimento, há possibilidade da presença de mecônio (MIES FILHO, 1987).

Como elementos de dissolução são encontrados substâncias orgânicas e inorgânicas. Os eletrólitos representam as substâncias inorgânicas, sendo alguns relacionados com a idade gestacional. Encontram-se cloretos, carbonatos e sulfatos de cálcio, sódio e potássio, uréia, creatinina e hidratos de carbono (MIES FILHO, 1987). Entre os compostos orgânicos estão proteínas, aminoácidos, alfa-fetoproteína, substâncias nitrogenadas não proteicas, lipídios, carboidratos, vitaminas, enzimas, bilirrubina, hormônios e prostaglandinas (CAMPANA et al., 2003). Além disso, encontram-se quantidades variáveis de mucina (MIES FILHO, 1987) e células que podem ser utilizadas para determinar o sexo do feto (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004).

Os fluidos pulmonares contribuem para a formação de LA durante a gestação. Acredita-se que os movimentos respiratórios fetais representem um dos mecanismos responsáveis pela mistura das secreções pulmonares com o LA. Essa falsa respiração intra-útero, já que não há presença de ar, é responsável pela presença dos corpos lamelares, e surfactante, no fluido amniótico (SEEDS, 1980).

O LA desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase fetal, com diversas funções que favorecem o desenvolvimento e o crescimento do feto. Entre as suas principais funções, destacam-se: crescimento externo do embrião; barreira contra infecções; impedimento físico à aderência entre o embrião e o âmnio, o que protege o embrião de traumatismos; controle da temperatura corporal do embrião; e auxílio à mobilidade do feto, que se move livremente dentro do líquido, contribuindo assim para seu desenvolvimento muscular. Além disso, o LA colabora na dilatação da cérvix no final da gestação e lubrifica o canal do parto (HAFEZ, 2004).

2.3. Citologia do Líquido Amniótico

O líquido amniótico é rico em células de descamação provenientes da cavidade amniótica, além de conter células de origem fetal. É possível conhecer o desenvolvimento de pele, mucosas respiratória e digestiva, das coberturas geniturinárias e das demais estruturas do feto que tenham contato com este líquido (CAMPANA et al., 2003).

Na literatura, preconiza-se a classificação dos tipos celulares de acordo com o tamanho, a morfologia e as propriedades tintoriais. Os componentes celulares que se tingem com corantes básicos são chamados basofílicos, sendo acidofílicos os que se ligam a corantes ácidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Segundo Bongso & Basrur (1977), a avaliação da celularidade dos fluidos fetais mostrou que a maioria das células presentes é realmente de origem fetal e que as características citológicas podem ser utilizadas para analisar as condições do feto bovino durante a gestação, com consequente possibilidade de avaliação da maturidade pulmonar. Assim, mediante o estudo citológico do líquido amniótico e suas modificações em relação ao período gestacional, é possível determinar a maturidade do feto (MOYA, 2005).

Para a visualização das células do líquido amniótico, um dos métodos empregados é a coloração com Sulfato de Azul do Nilo. Estabeleceu-se, em seres humanos, a proporção de células lipídicas coradas por esta técnica, que

se apresentam alaranjadas, sendo, por isto, denominadas orangiofílicas. A presença de uma grande quantidade de células lipídicas alaranjadas no fluido amniótico é um indicativo da maturidade das glândulas sebáceas, e a porcentagem dessas células está diretamente relacionada com a maturidade fetal (KJELDSBERG e KNIGHT, 1993).

As células orangiofílicas praticamente inexistem no início da gestação, aparecem em pequena proporção no terço médio e proliferam até o momento do parto representando cerca de 50 a 95% da população celular encontrada no líquido amniótico de mulheres, com valores maiores encontrados nos fetos mais velhos. Assim, esse tipo de análise citológica é um bom meio para predizer a idade fetal (SOUZA et al., 2000).

Além da coloração pelo Azul de Nilo, Martins & Prestes (2003) sugeriram, em trabalho realizado em cadelas, que a coloração pelo método Hematoxilina-Shorr, embora seja um processo mais trabalhoso e, portanto, mais lento, é aquele que permite melhor avaliar a morfologia e determinar o estágio de maturação fetal em virtude de suas características tintoriais, mostrando-se um método mais fidedigno do que o teste do Azul de Nilo.

2.4. Contagem de Corpos Lamelares

Os testes de maturidade pulmonar podem ser divididos em dois grupos: os testes que dosam a presença do material surfactante no líquido amniótico e aqueles que testam a função surfactante presente nesse líquido, baseados na capacidade dessa substância de diminuir a tensão superficial nos líquidos provenientes das vias aéreas, como, por exemplo, o teste de Clements (VIEIRA, 2010).

Entre os testes de dosagem incluem-se: relação lecitina/esfingomielina, dosagem da fosfatidilcolina saturada, dosagem do fosfatidilglicerol, perfil dos fosfolípidios, dosagem das proteínas específicas do surfactante e a contagem dos corpos lamelares (VIEIRA, 2010).

O teste considerado “padrão ouro” para a maturidade fetal tem sido a relação lecitina/esfingomielina (L/E). A esfingomielina é um lipídio de membrana inespecífico presente no LA, ou seja, não está relacionada com eventos de maturidade pulmonar. Já a lecitina é o principal componente fosfolipídico do surfactante na avaliação da maturidade pulmonar. Assim, quanto maior sua concentração (e por consequência, maior a relação L/E), mais maduro está o pulmão fetal. Este teste normalmente é realizado por cromatografia (CASTAGNETTI et al., 2007).

Com relação à aplicabilidade deste teste na Medicina Veterinária, pode-se citar o estudo de Eigenmann et al. (1984), que trabalharam com 35 bezerros provenientes de cesariana realizada com idade fetal entre 247 a 284 dias gestacionais, e as relações L/E foram mensuradas nos bezerros com e sem angústia respiratória. Em bezerros maduros não houve mortes e a relação L/E foi maior que 2,6, ao passo que dos 20 bezerros com sintomas de SAR, 11 vieram a óbito e a relação L/E foi menor que 1,5, havendo diferença estatística entre os grupos. Apesar da relevância destes achados, a relação L/E é um método caro, demorado, não prático, e que, por isso, está caindo em desuso até mesmo na Medicina. Assim, não seria vantajoso adotar este teste na rotina clínica veterinária.

Em contrapartida, o método da contagem dos corpos lamelares (CCL), mais prático e de baixo custo, foi introduzido, em 1989, na Medicina, como uma alternativa viável para predição da maturidade pulmonar fetal. Os corpos lamelares são reservatórios de fosfolipídios, componentes do surfactante pulmonar, que são levados ao líquido amniótico por meio do movimento respiratório fetal. A técnica, em seres humanos, consiste na contagem dos corpos lamelares em amostras do líquido utilizando contadores automáticos de partículas (hematológicos), cada vez mais comuns nos laboratórios de análises clínicas (LJUBIC et al., 2009).

A determinação do número de corpos lamelares humanos é realizada utilizando-se o mesmo parâmetro de ajuste para contagem de plaquetas (2 a 20fL), pois eles possuem volume médio entre 1,7 e 7,3fL e diâmetro entre 2 e 5µm, semelhantes ao das plaquetas da espécie, o que os torna facilmente reconhecíveis pelo aparelho (GIL et al., 2010).

Assim, o teste da CCL foi sugerido por alguns autores como teste de rastreamento de maturidade pulmonar por apresentar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) comparáveis aos testes de referência (DEROCHE et al., 2002; ABD et al., 2005). Além disso, podemos destacar outros benefícios, como a necessidade de pequeno volume de amostra para o exame. Dubin (1989) considerou que quando a CCL é indicativa de que o feto é maduro, os demais testes, mais custosos e demorados, são desnecessários. De acordo com o protocolo adotado pela Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), CCL maior que 32.000 é indicativa de maturidade pulmonar.

Para que este tipo de metodologia seja aplicado à espécie bovina, os corpos lamelares tem que apresentar, necessariamente, tamanho similar ao das plaquetas, de maneira que o analisador hematológico consiga realizar a contagem. Como o tamanho e a aparência dessas estruturas, em bovinos, não eram conhecidos, foi necessário realizar microscopia eletrônica em líquido amniótico da espécie bovina em busca do reconhecimento inicial dos corpos lamelares para, posteriormente, verificar se seria possível aplicar a mesma metodologia usada na Medicina.

A Figura 1 retrata a aparência dos corpos lamelares nas diferentes espécies, de acordo com a observação de quatro trabalhos da literatura.

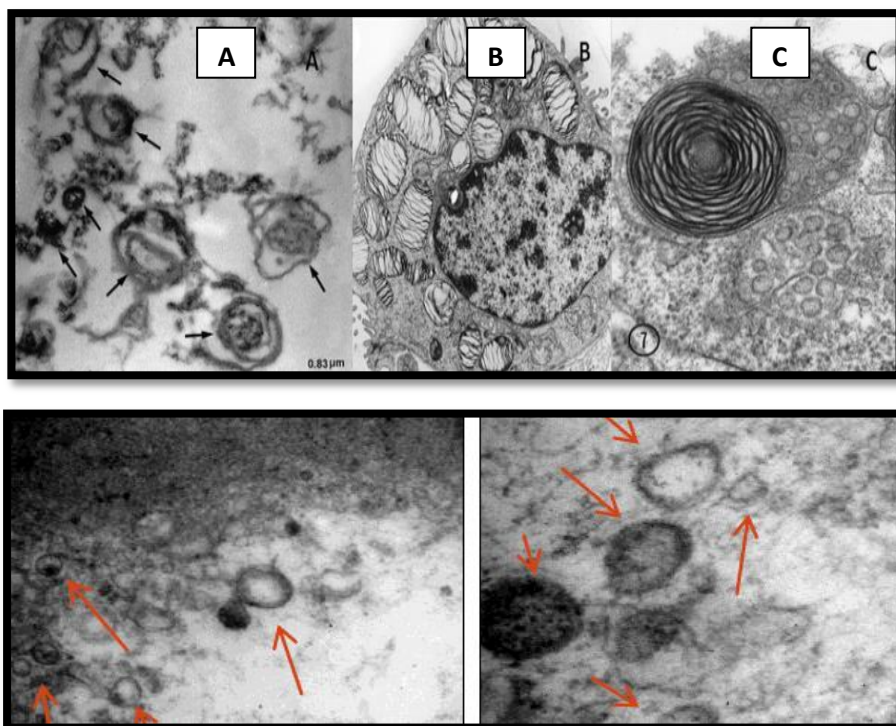


FIGURA 1. A) Microscopia eletrônica evidenciando corpo lamelar em líquido amniótico da espécie equina (CASTAGNETTI et al., 2007); B) Microscopia eletrônica de corpo lamelar humano inserido em parênquima pulmonar (WONG et al., 1998); C) Microscopia eletrônica de corpo lamelar de rato em parênquima pulmonar (STAHLMAN et al., 2000); D) Microscopia eletrônica de corpo lamelar de ovino em líquido amniótico (SOUZA, 2014).

2.5. Teste de Clements

Clements et al. (1972) propuseram um teste rápido, simples e seguro para avaliar a maturidade fetal, que se baseia na capacidade que o surfactante pulmonar tem de formar bolhas estáveis quando em contato com o etanol a 95%. Os tubos, contendo líquido amniótico diluído em solução fisiológica em diferentes proporções e álcool, são homogeneizados e avaliados conforme a formação do anel de bolhas: positivo quando há bolhas formando um anel completo, intermediário quando houver bolhas que não completam o anel e negativo quando as bolhas estiverem ausentes.

No que diz respeito à acurácia do teste de Clements, na espécie humana, ele praticamente não apresenta resultados falso-positivos, variando em proporções de 1 a 3%, já que amostras contaminadas com sangue ou mecônio podem resultar em falso-positivos. Entretanto, 8% a 10% dos testes mostram-se falso-negativos (AMORIM et al., 1998).

Barreto et al. (2011), em estudo com avaliações do líquido amniótico de cadelas, observaram que não houve formação de halo de espuma, utilizando a metodologia do Teste de Clements original, mesmo em líquidos de neonatos nascidos a termo e maduros. Assim, estes autores adaptaram o mesmo teste, propondo técnica onde o líquido amniótico não seria diluído em solução fisiológica, apenas no álcool, o que proporcionou a formação de anéis de bolhas estáveis em mais tubos, quando havia suficiente produção de surfactante pelo feto. Estes resultados comprovaram que o teste de Clements modificado foi fidedigno para predizer a maturidade pulmonar em cães.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi padronizar as características do líquido amniótico quanto à coloração, aspecto, viscosidade, presença de surfactante pelo teste de Clements, avaliação dos corpos lamelares e citologia de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca, nascidos maduros e a termo, hígidos e com vitalidade comprovada por escore Apgar, exame físico geral, mensuração de pH sanguíneo e medidas de comprimento de coluna e de amplitude respiratória.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 50 bezerros sadios da raça Holandesa Preta e Branca (30 fêmeas e 20 machos) provenientes de propriedade localizada em Descalvado, no interior de São Paulo. Este município localiza-se na latitude 21°54'14" Sul com a longitude 47°37'10" Oeste, e tem altitude de 679 metros do nível do mar. O clima da região é temperado (média de 24°C) com umidade relativa do ar de 20 a 30% e índice pluviométrico anual de 1.100 a 1300 mm. As coletas foram realizadas no primeiro semestre de 2014.

A propriedade em questão possui aproximadamente 1500 vacas em lactação (em média 40L de leite/vaca/dia), de um total de 3600 fêmeas, entre jovens e adultas, todas elas puras de origem, com pedigree na Associação Brasileira da Raça Holandesa. As fêmeas em idade gestacional avançada eram mantidas em regime semi-intensivo no Setor de Maternidade, sendo transferidas para baias individuais de parição na semana prevista para o parto, onde eram monitoradas durante o dia todo. É importante salientar que a equipe de pesquisa não modificou o manejo habitual da propriedade, mas sim se adaptou às condições de trabalho existentes.

Para que os recém-nascidos estudados fossem classificados como hígidos e maduros, eles foram avaliados ao nascimento, considerando os seguintes aspectos:

Duração da gestação: todos os animais utilizados no experimento nasceram na semana prevista para o parto - a duração média da gestação foi estabelecida em 278 dias, de acordo com Jainudeen & Hafez (2004) - e estas previsões foram fornecidas pela administração da propriedade, que tinha o controle pelas datas da inseminação artificial e diagnóstico ultrassonográfico de prenhez. As vacas gestantes foram acompanhadas por, no mínimo, sete dias antes do parto e se mantiveram, durante esse acompanhamento, clinicamente saudáveis.

Acompanhamento dos nascimentos: todos os partos foram monitorados desde os pródromos até o término da fase de expulsão do feto. Assim, na ocorrência de distocias, a intervenção obstétrica foi realizada de forma adequada para cada caso. O auxílio obstétrico foi realizado por meio de tração leve (força de uma pessoa) através do uso de correntes obstétricas após posicionamento correto do bezerro insinuado. A intervenção ocorria quando se observava anormalidades de estática fetal, tamanho exagerado do neonato ou quando a vaca parturiente deixava de apresentar contrações ou manifestava desconforto incomum, já estando com a bolsa amniótica rompida por um período superior a duas horas. Com isso, preveniu-se a ocorrência de sofrimento fetal por trabalho de parto demorado, evitando-se consequente hipóxia e diminuição da vitalidade do recém-nascido. Os animais foram monitorados até os sete dias de vida, período no qual permaneceram sem indícios de doença. Suas respectivas placentas também foram examinadas macroscopicamente, e não apresentaram alterações.

Triagem pelo score Apgar: no momento em que a vaca terminava de expulsar o bezerro, ou seja, no primeiro minuto de vida, foi adotada a escala de Apgar modificada por Born, em 1981, como forma de identificar precocemente os neonatos com alteração da vitalidade. Nesta escala são avaliados quatro itens, pontuados de zero a dois cada um, a saber:

I) Movimentação da cabeça: zero, se ausente; um ponto, se diminuída; e dois, caso fosse espontânea e com movimentos ativos;

II) Reflexos óculo-palpebral e interdigital: zero, se ausentes; um ponto, se houvesse apenas um reflexo; e dois, caso os dois reflexos estivessem presentes;

III) Tipo de respiração: zero, se imperceptível (apnéia); um ponto, se lenta e arritmica; e dois, caso fosse rítmica e de profundidade normal;

IV) Coloração das mucosas aparentes: zero, se esbranquiçadas; um ponto, se azuladas; e dois, caso fossem róseas ou avermelhadas.

A somatória da pontuação do score para os quatro itens avaliados foi interpretada da seguinte forma:

- I) Sete a oito pontos: neonato com boa vitalidade;
- II) Quatro a seis pontos: animal com moderada vitalidade;
- III) Pontuação entre zero e três: recém-nascido deprimido, com baixa vitalidade.

Para este trabalho, foram utilizados apenas bezerros com escore sete ou oito, sendo critério de exclusão pontuação menor.

Comprimento de coluna: medida realizada com auxílio de fita métrica para avaliar o tamanho do recém-nascido. A medida compreendeu desde a articulação atlanto-occipital até a primeira vértebra coccígea.

Amplitude respiratória: medida realizada com auxílio de fita métrica para avaliar a expansão da caixa torácica do neonato. A medida foi realizada, com o animal ainda em decúbito, na circunferência torácica (altura da décima terceira costela), no final da inspiração, ou seja, em sua expansão máxima.

Exame físico geral: foram avaliados, dentro dos primeiros cinco minutos de vida do neonato, mucosas aparentes, frequências cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar e temperatura retal, conforme métodos semiológicos preconizados por Feitosa e Benesi (2014). No momento do exame geral também foram observadas características da pelagem, dos cascos e da dentição, em busca de indícios de prematuridade (dentes encobertos por gengiva, cascos excessivamente flexíveis, pelos finos e curtos, e pelagem do umbigo).

pH venoso: a veia jugular externa do neonato foi puncionada no primeiro minuto de vida, utilizando-se agulha 30X10 acoplada a seringa de 1mL previamente heparinizada. A avaliação hemogasométrica foi processada logo após a coleta em aparelho portátil analisador de pH, eletrólitos e gases sanguíneos (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA). Foram utilizados cartuchos CG7+ (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA) para mensuração do pH.

4.2. Coleta do líquido amniótico

O líquido amniótico foi coletado com auxílio de seringa de polietileno de 20mL e agulha 40X12 por punção e aspiração da bolsa amniótica, no momento em que ela se expunha no canal do parto das vacas gestantes. Caso a bolsa amniótica rompesse antes da exposição pela vulva, a amostra de LA não era utilizada, para evitar possíveis contaminações ou interferências.

O volume colhido foi transferido para tubo seco de polietileno com capacidade de 30mL, identificado e as provas imediatas ao nascimento foram realizadas (análise de coloração e aspecto, e teste de Clements). O material restante foi transferido para tubos de *Eppendorf* identificados, que foram mantidos congelados em *freezer* a -20°C até a realização dos demais testes (análise dos corpos lamelares, teste do Azul de Nilo e coloração pelo método de Hematoxilina-Shorr), que ocorreu em, no máximo, 60 dias após a coleta.

4.3. Análise do líquido amniótico

O líquido amniótico foi analisado conforme o protocolo adotado na rotina laboratorial da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Unesp, com pequenas adaptações, como segue:

Análise de Coloração e Aspecto: o líquido foi classificado quanto à coloração (clara, amarelada ou avermelhada), aspecto (turvo ou não) e viscosidade (pouco viscoso/+, viscoso/++ ou muito viscoso/+++). Além disso, foi registrada a presença ou ausência de grumos.

Teste de Clements: para sua realização, utilizaram-se cinco tubos com diluições diferentes do líquido amniótico (LA), solução fisiológica a 0,9% (SF) e etanol a 95% (E):

1° tubo: 1mL LA + 1mL E

2° tubo: 0,75mL LA + 0,25mL SF + 1mL E

3° tubo: 0,5mL LA + 0,5mL SF + 1mL E

4° tubo: 0,25mL LA + 0,75mL SF + 1mL E

5° tubo: 0,2mL LA + 0,8mL SF + 1mL E

Os tubos foram fechados com tampas de borracha e agitados, leve e manualmente, durante 15 segundos. Em seguida, foram alocados verticalmente em suportes. Após 15 minutos a leitura foi realizada considerando a quantidade de bolhas estáveis formadas no tubo. O teste foi interpretado como positivo quando ocorreu a formação de anel completo de bolhas, intermediário se o anel fosse incompleto e negativo quando não foi observada a presença de bolhas.

Além do Teste de Clements original (CLEMENTS et al., 1972), também foi realizado o Teste de Clements modificado por Barreto (BARRETO et al., 2011), onde a amostra de LA não foi diluída com solução fisiológica, apenas no etanol a 95%, da seguinte forma:

1° tubo: 1mL LA + 1mL E

2° tubo: 0,9mL LA + 1mL E

3° tubo: 0,8mL LA + 1mL E

4° tubo: 0,7mL LA + 1mL E

5° tubo: 0,6mL LA + 1mL E

Outra metodologia foi testada pelos autores do presente trabalho, e constituiu na mistura de 3mL da amostra com 1mL de etanol a 95% e realização das etapas posteriores (homogeneização, descanso de 15 minutos em posição vertical e observação do halo de bolhas) de forma semelhante ao teste de Clements original.

Contagem de Corpos Lamelares (CCL): a técnica utilizada foi adaptada a partir da descrita por Dubin em 1989. Consistiu na CCL através do canal de contagem de plaquetas do contador automático de partículas (analisador

hematológico comum). Visando a padronização da rotina laboratorial, Neerhof et al. (2001) criaram o seguinte protocolo:

- I) Misturar a amostra de líquido amniótico invertendo o frasco cinco vezes;
- II) Transferir o líquido para um frasco transparente de teste;
- III) Excluir as amostras que contenham sangue ou mecônio;
- IV) Colocar o tubo em um homogeneizador por 2 minutos;
- V) Passar o diluente puro no contador de células até que o zero seja obtido em duas vezes consecutivas para realizar a leitura em branco;
- VI) Passar a amostra de líquido amniótico no contador de células e registrar o resultado obtido no canal de plaquetas como o número de corpos lamelares.

Microscopia Eletrônica: para o processamento das amostras de líquido amniótico para a microscopia eletrônica de transmissão, o material coletado foi fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído a 8%, glutaraldeído a 25% e tampão fosfato 0,2M em pH 7,3, na proporção 5:1:4) e mantido a temperatura ambiente por quatro horas. Após o tempo de fixação, o material foi mantido refrigerado até o processamento, que foi realizado da seguinte forma:

- I) Para retirar o fixador, foram feitas várias passagens da amostra em água destilada sobre placa de resina odontológica;
- II) Após a lavagem foi colocada sobre a amostra uma grade de cobre com película de carbono de 150-200 mesh;
- III) A película ficou em contato com o líquido amniótico por uma hora;
- IV) A película foi então lavada através de passagens em gotas de água destilada e seca em papel filtro comum;
- V) Procedeu-se a coloração da película contendo o material com acetato de uranila a 4%. Para isso, a película ficou em contato com a gota do corante por 20 minutos;
- VI) Novamente procedeu-se a lavagem da película que foi mantida em repouso para secagem ao ar livre por 24 horas;

VII) O exame do material foi realizado em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit FEI Company® (Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – IBB/UNESP) para que fossem encontrados e fotografados os corpos lamelares.

Teste do Azul de Nilo: em uma lâmina, foi adicionada uma gota (50µl) do líquido amniótico e uma gota do corante Azul de Nilo a 0,1%, misturando-as em seguida. Após cobrir com lamínula, foi realizada a leitura em microscópio óptico. Contaram-se cinco campos (sendo necessário observar os dois tipos de células em cada campo: as orangiofílicas - alaranjadas - e as acidofílicas - azuis) em cada lâmina. Anotou-se o total de cada tipo de células e, com base no total geral, chegou-se ao percentual de células orangiofílicas.

Hematoxilina-Shorr: as amostras de líquido amniótico foram inicialmente centrifugadas a 1160 x G, por 3 minutos, para que o muco da amostra fosse isolado. Posteriormente, devido à sua baixa celularidade, as amostras foram submetidas a cito-centrifugação a 130 x G, por 6 minutos. Procedeu-se então a fixação com álcool 95% e depois o procedimento de coloração, em 19 passos, como descrito a seguir:

- I) Álcool 80% - 10 mergulhos;
- II) Álcool 70% - 10 mergulhos;
- III) Álcool 60% - 10 mergulhos;
- IV) Água corrente – 10 minutos;
- V) Hematoxilina – 1 minuto;
- VI) Água corrente – 10 minutos;
- VII) Álcool 50% - 10 mergulhos;
- VIII) Álcool 60% - 10 mergulhos;
- IX) Shorr – 6 minutos;
- X, XI, XII) Álcool 95% - 10 mergulhos;
- XIII, XIV, XV) Álcool absoluto – 10 mergulhos;
- XVI, XVII, XVIII) Xilol – 10 mergulhos;

XIX) Cobrir com resina de montagem e lamínula.

Após o preparo da lâmina foi realizada a leitura em microscópio óptico. Contaram-se cinco campos (sendo necessário observar os dois tipos de células em cada campo: as orangiofílicas - alaranjadas - e as acidofílicas - azuis) em cada lâmina. Anotou-se o total de cada tipo de células e, com base no total geral, chegou-se ao percentual de células orangiofílicas.

4.4. Análise Estatística

O cálculo do número de animais utilizados (n=50) foi feito com base na precisão desejada do estudo (Dohoo et al., 2010). Todas as variáveis tiveram sua distribuição analisada para verificação de normalidade, de maneira a orientar a escolha dos testes estatísticos.

Como o objetivo deste trabalho foi estabelecer valores padrões para neonatos da Raça Holandesa, nascidos hígidos e maduros, as variáveis contínuas foram submetidas inicialmente a estatísticas descritivas: média, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.), erro padrão (EP), desvio padrão (DP), e intervalo de confiança 95% (IC 95%). Distribuições de frequência foram produzidas para apresentar os resultados das variáveis nominais e ordinais.

Para comparar as médias da variável contínua normal pH sanguíneo entre os tipos de parto, utilizou-se o “teste t” não pareado, pois se tratavam de amostras independentes. Para estimar a correlação entre a proporção de células alaranjadas e azuis nos dois tipos de colorações utilizados neste trabalho (Azul de Nilo x Hematoxilina-Shorr), utilizou-se o “coeficiente de Pearson”. As análises foram realizadas com GraphPad Prism[®] 5 e SAS 9.3[®] em nível de significância estatística de 5%.

4.5. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Campus de Botucatu (Protocolo 241/2012), em fevereiro de 2013. O proprietário da fazenda onde a fase experimental foi realizada assinou termo de consentimento para uso de seus animais em Projeto de Pesquisa, conforme o modelo que consta no Anexo I.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. O Neonato

5.1.1. Tipo de Parto

A distocia, definida como parto difícil ou com obstrução, pode ocorrer por causas mecânicas, fetais ou maternas (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004). Dos 50 animais estudados, 20 nasceram por parto eutócico (40%) e os outros 30 bezerros (60%) por meio de tração forçada leve (apenas uma pessoa), com auxílio de correntes obstétricas. Todas as distocias observadas foram de origem fetal: fetos relativamente grandes em relação à mãe (70%) ou com estática anormal (30%), representada por apresentação posterior, flexão de membros torácicos ou do pescoço. Os desvios de cabeça e a flexão de várias articulações na apresentação anterior podem causar distocia, comum nas raças de gado leiteiro, assim como fetos de tamanho acima do normal ou com apresentação posterior (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004).

Durante o trabalho de parto instalam-se distúrbios na circulação sanguínea uteroplacentária em função das contrações do miométrio, resultando em menor aporte de oxigênio para o feto (WALSER e MAURER-SCHWEISER, 1979). Assim, no caso de partos demorados, essa deficiência na oxigenação do feto é ainda maior, predispondo o neonato a graus mais acentuados de acidose, com consequente diminuição de vitalidade.

A relação lógica entre distocia e o prejuízo da circulação materno-fetal foi motivo de discussão no estudo de Massip (1980), o qual concluiu que no caso de partos distócicos os bezerros apresentavam acidose mais pronunciada que animais oriundos de partos eutócicos, porém o comprometimento maior advinha de neonatos obtidos por cesariana de emergência. Porém, Maurer-Schweiser et al. (1977) consideraram que bezerros provenientes de partos normais e bezerros com nascimento auxiliado por tração leve apresentam características de vitalidade e resultados de pH sanguíneo semelhantes.

No presente estudo, os neonatos foram selecionados de diversas formas para exclusão de animais prematuros, doentes ou com vitalidade diminuída. Por isso, pode-se dizer que, neste caso, os bezerros tinham características que os incluíam no grupo de trabalho experimental independentemente do tipo de parto do qual provinham.

É importante frisar neste tópico da discussão o tipo de manejo adotado na maternidade da propriedade, que influenciou positivamente nesta pesquisa: duas vezes ao dia os piquetes eram inspecionados em busca de animais com sinais de parto iminente, e vacas que tinham data de parto prevista para aquela semana eram separadas do lote. Os animais selecionados eram mantidos em baias de parição, onde a equipe de apoio os monitorava durante as 24 horas do dia. Assim, casos de distocia eram detectados precocemente e solucionados. Consequentemente, os animais experimentais não permaneceram longo tempo em distocia e não desenvolveram perda de vitalidade por possível acidose (Tab. 3).

A maior parte dos partos distócicos, neste caso, ocorreu pelo grande tamanho do feto em comparação com o das vias fetais das mães. Uma hipótese que explicaria esse fato seria a de ter havido, no período experimental, grande número de partições de novilhas, que reconhecidamente tem menor tamanho de pelve e maior incidência de partos distócicos (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004).

5.1.2. Amplitude Respiratória e Comprimento de Coluna do Bezerro

Os resultados destas variáveis estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para amplitude respiratória e comprimento de coluna de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
Amplitude Torácica (cm)	50	79	77-80	0,69	4,9	69	95
Comprimento de Coluna (cm)	50	90	88-92	0,78	5,5	76	104

O conhecimento da idade fetal é importante subsídio na Clínica Veterinária. Para tanto, existem alguns padrões biométricos fetais estabelecidos nos diferentes estágios de gestação para grandes animais, baseados no tamanho e características gerais de desenvolvimento, por meio de mensurações realizadas com auxílio de ultrassonografia transretal (WOLF e GABALDI, 2002). Analogamente, ao realizarmos a mensuração do comprimento de coluna logo após o nascimento, podemos inferir a idade gestacional na qual o bezerro se encontra no momento do parto.

Assim, para determinação da idade gestacional, utilizou-se o comprimento equivalente à distância céfalo-coccígea (obtida da articulação atlanto-occipital até a primeira vértebra coccígea), de acordo com Mies Filho (1987), que descreveram, sem caracterização racial, que fetos no sétimo mês de gestação apresentam comprimento médio de 63cm, no oitavo mês de 80cm e no nono mês, já a termo, o comprimento médio atinge os 99cm, de acordo com a fórmula estabelecida, por estes mesmos autores, como mês gestacional multiplicado pelo valor do mês gestacional + 2. De acordo com essa referência, a média de comprimento de coluna dos animais utilizados em nosso experimento foi abaixo do descrito para animais a termo. Porém, há de se considerar as variações individuais e de raça, já que o trabalho citado não definiu um padrão racial.

Por outro lado, Moura et al. (2009), estabeleceram que fetos bovinos em terço final de gestação possuem comprimento ápico-caudal, correspondente à distância céfalo-coccígea, que varia entre 53,4 e 91cm, estando esses valores mais próximos aos encontrados no presente trabalho. Com relação ao presente experimento, é importante salientar que a variável comprimento de coluna apresentou distribuição normal, o que faz da média um valor representativo do conjunto, e que o desvio padrão associado a ela teve um baixo valor, indicando que o grupo foi homogêneo, ou seja, para a propriedade em questão, naquelas condições, os animais a termo tiveram o comprimento médio de 90cm (Tab. 1).

O valor encontrado para a amplitude respiratória média, que correspondeu ao perímetro torácico máximo, foi de 79cm (Tab.1), média também associada a pequeno desvio padrão inerente às variações individuais. Não foram encontrados dados na literatura para comparação desta variável, porém a medida da amplitude respiratória torna-se importante por estar relacionada com a complacência pulmonar, a instabilidade músculo-esquelética e a maturidade geral da caixa torácica, fatores que permitem a expansão do pulmão na inspiração para que ocorra a adequada entrada de ar e, conseqüentemente, as trocas gasosas. Assim, com este trabalho estabeleceu-se o valor médio e o desvio-padrão esperados para essa variável, em bezerros recém-nascidos da raça Holandesa Preta e Branca, tornando-se mais um item a ser considerado na avaliação da maturidade do neonato bovino.

5.1.3. Exame Físico

5.1.3.1. Mucosa

A maioria dos animais, 47 bezerros (94%), nasceu com as mucosas róseas. Dois animais (4%) estavam com a mucosa azulada logo após o nascimento e apenas um bezerro (2%) apresentou mucosa avermelhada com congestão.

De acordo com Feitosa e Benesi (2014) a coloração normal esperada para as mucosas aparentes é a rósea, tanto assim que 94% dos animais se encaixaram nessa classificação. Dois bezerros apresentaram mucosas de coloração azulada (cianóticas). Conforme explicado anteriormente, o neonato passa por episódio de deficiência de oxigenação por ocasião do parto e, provavelmente, esses dois animais manifestaram sua hipercapnia de maneira mais evidente que os demais. Embora a manifestação de cianose expresse *déficit* na oxigenação do sangue, somente foram mantidos no experimento os recém-nascidos com índice Apgar 7 ou 8, ou seja, tratavam-se de animais com boa vitalidade.

O fato de ter havido um único bezerro com congestão em mucosa ocular pode ser explicado pelo tipo de baia na qual as vacas pariam, que continha cama de areia. Esse neonato, já se encontrando insinuado e com parte dos membros torácicos e cabeça para fora do canal vaginal, ficou com os olhos em contato com a areia da baia por tempo prolongado devido ao posicionamento da vaca parturiente, o que pode ter causado a irritação e congestão dos vasos e mucosas oculares.

5.1.3.2. Tempo de Preenchimento Capilar (TPC)

Todos os animais apresentaram TPC de até dois segundos: 37 bezerros (74%) tiveram TPC de dois segundos e 13 neonatos (26%) tiveram TPC de um segundo. Assim, a totalidade dos animais esteve dentro dos parâmetros de normalidade estabelecidos por Feitosa e Benesi (2014) para o tempo de preenchimento capilar, indicando que todos os inclusos no estudo estavam em boas condições circulatórias e perfusão adequada.

5.1.3.3. Frequência Cardíaca (FC), Frequência Respiratória (FR) e Temperatura Retal (TR)

Os resultados destas variáveis estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de bezerras da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
FC (bpm)	50	138	130-145	3,7	26	76	200
FR (mpm)	50	43	40-45	1,3	8,9	24	64
TR (°C)	50	39	39-39	0,11	0,75	35	40

Lisbôa et al. (2002) trabalharam com 300 bezerras sadias da Raça Holandesa distribuídas por diferentes grupos etários para padronizar as variáveis do exame físico e da hemogasometria, e observar a influência da idade sobre elas. Em seu trabalho, o primeiro grupo compreendeu neonatos com até 8 horas de vida, englobando a faixa etária dos recém-nascidos do presente estudo. Os valores médios com seus desvios padrão para frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal foram, respectivamente, $139,1 \pm 25,6$ bpm; $58,1 \pm 25,0$ mpm e $38,5 \pm 0,7$ °C, sendo concordes e abrangendo, dessa forma, os valores médios encontrados neste trabalho (Tab.2).

É importante frisar que os parâmetros de funções vitais variam conforme a idade do animal dentro da vida jovem (FEITOSA e BENESI, 2014) e diferem também dos animais adultos, sendo sempre indicado utilizar como referenciais os parâmetros estabelecidos para cada faixa etária. Neste caso também as variáveis FC, FR e TR apresentaram distribuição normal, o que faz da média um valor representativo do conjunto, ainda mais quando consideramos o baixo desvio padrão associado a ela. Assim, este trabalho pode estabelecer referência de parâmetros para o exame físico geral de neonatos bovinos nos primeiros minutos de vida, ou seja, refletiu exatamente as condições do início da adaptação pós-natal.

5.1.4. Resultados do Escore Apgar

Como os animais utilizados neste experimento eram necessariamente hígidos e maduros, 100% dos animais apresentaram escore 7 ou 8 na escala de Apgar, ou seja, eram animais com alta vitalidade: 15 bezerros (30%) com escore 7 e 35 (70%) com escore 8.

O escore de Apgar é utilizado amplamente nas maternidades de todo o mundo como o melhor método para avaliação clínica do neonato no momento imediato após o parto. Na Medicina Veterinária, estudos vêm sendo realizados e adaptações ao método original estão sendo desenvolvidas para um auxílio eficaz na identificação dos neonatos de risco. A pontuação serve para identificar neonatos que necessitem de atenção médica emergencial, principalmente nos primeiros minutos de vida, possibilitando, assim, uma intervenção mais rápida e eficiente (VASSALO et al., 2014). Frente a isso, a escolha de animais com alto escore Apgar preveniu a seleção, no presente trabalho, de bezerros com baixa vitalidade ou doença imediatas ao nascimento, como a SAR.

5.1.5 pH venoso

O resultado desta variável está apresentado na Tabela 3.

TABELA 3. Resultado da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), média, intervalo de confiança (IC 95%), erro padrão (EP), desvio padrão (DP), valor mínimo (Mín) e máximo (Máx) para o pH sanguíneo de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento: pH geral, pH dos animais nascidos por eutocia e pH dos animais nascidos por distocia.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
pH	50	7,22	7,20-7,24	0,01	0,06	6,99	7,34
pH eutocia	20	7,21	7,19-7,23	0,01	0,05	7,1	7,32
pH distocia	30	7,22	7,20-7,25	0,01	0,07	6,99	7,34

Sabe-se que a síntese de surfactante é influenciada pelo pH, pela temperatura corporal e pela perfusão, sendo comprometida nos quadros de acidose (BITTAR, 2000). Já foi comentado anteriormente que os neonatos utilizados nesta pesquisa apresentaram temperatura retal dentro dos limites estabelecidos para a espécie bovina, assim como seu TPC também foi considerado normal, refletindo boa perfusão capilar.

Com relação ao pH médio, Lisbôa et al. (2002) referem $7,3 \pm 0,04$, ou seja, a faixa de pH estabelecida por esses autores é de 7,26 a 7,34, valores ligeiramente mais altos do que os obtidos no presente trabalho. Porém, há de se considerar que a faixa etária observada por Lisbôa et al. (2002) compreendeu animais de até 8 horas de vida, e que com o decorrer do tempo o organismo do recém-nascido se adapta às condições extra-uterinas e consegue minimizar a acidose transitória pós nascimento. Assim, espera-se que mensurações ao nascimento possuam pH menor, como aconteceu neste estudo.

Outro fator que pode ser comprovado por meio da análise dos resultados de pH deste trabalho, é que a tração leve executada nos partos distócicos mencionados não causou graus mais severos de acidose, já que não houve diferença estatística no pH dos animais provenientes de eutocia e distocia ($p=0,44$). Assim, não houve alterações ocasionadas por acidose entre esses

animais no que se refere à produção de surfactante, o que permite considerá-los como um grupo homogêneo.

5.2. Resultados obtidos com a Análise do Líquido Amniótico

5.2.1. Coloração e Aspecto

Das 50 amostras de líquido amniótico analisadas, 43 (86%) apresentaram coloração clara, cinco (10%) coloração amarelada e dois (4%) a coloração avermelhada. Segundo o protocolo da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), a cor clara é considerada normal para a gestação a termo em humanos. Achados semelhantes são encontrados em ovinos e roedores (ZOGNO et al., 2004; SOUZA, 2014).

A cor amarela teve origem na contaminação do líquido amniótico com o alantoideano no momento da coleta, pois uma grande quantidade era liberada, momentos antes da exposição do âmnio, ficando parte desse líquido alantoideano no canal vaginal. Fortalece essa hipótese o fato de que nenhum animal nasceu tingido por mecônio. Pode-se com isto descartar a contaminação do fluido amniótico por esta substância como causa da cor amarelada. A cor avermelhada ocorreu devido à contaminação por sangue no momento da punção, que às vezes atingia pequenos vasos da membrana amniótica.

Com relação ao aspecto, todas as amostras mostraram-se turvas, sendo que 13 delas (26%) apresentaram também grumos de coloração branca. Os resultados da classificação quanto à viscosidade distribuíram-se da seguinte forma: sete amostras pouco viscosas (+/14%), 30 amostras com viscosidade intermediária (++/60%) e 13 amostras muito viscosas (+++/26%).

De acordo com o protocolo adotado na Faculdade de Medicina de Botucatu, no qual o presente estudo se baseia, quando o líquido amniótico apresenta-se transparente e sem grumos é indício de imaturidade pulmonar, e o líquido turvo e viscoso, com grumos, é proveniente de feto maduro. No

entanto, em bezerros, não foi observada essa relação, visto que todos os animais estavam maduros e, mesmo assim, alguns apresentaram líquido amniótico pouco viscoso ou sem grumos.

5.2.2. Teste de Clements

Não houve amostras positivas no teste de Clements originalmente proposto por Clements et al. (1972), e resultado igual foi obtido após a aplicação do teste de Clements modificado por Barreto et al. (2011), ou seja, todas as amostras de fluido amniótico foram negativas. Frente ao insucesso desses dois testes, a metodologia sofreu adaptações e, a partir de sucessivas tentativas com quantidades crescentes de LA, verificou-se que quando misturado 3mL de líquido amniótico com 1mL de etanol 95% exclusivamente, ou seja, sem adição de solução fisiológica, as amostras formavam o anel completo de bolhas, indicando positividade do teste. Após esta modificação, 100% dos líquidos testados foram positivos, mostrando a aplicabilidade do teste modificado na espécie bovina, já que animais maduros terão teste positivo, nessas condições de diluição.

Amostras de líquido amniótico de animais prematuros e com sinais clínicos de SAR precisam ser testadas posteriormente, para que se confirme se a técnica adaptada neste estudo (com a diluição de 3mL) será negativa em animais com deficiência na quantidade ou qualidade de surfactante produzido. Para isso, seria necessário adotar a técnica de amniocentese durante o período final da prenhez, já que a coleta de LA proveniente de matadouro não é eficaz. Isso porque durante o processo de abate, o feto entra em sofrimento e contamina com mecônio o líquido amniótico, fazendo com que o Teste de Clements seja sempre positivo, independente da diluição (falso-positivo).

Este teste é particularmente interessante por se tratar de uma técnica simples e aplicável na rotina clínica, porém mais estudos são necessários para confirmarmos o ponto de corte na diluição entre animais maduros e prematuros.

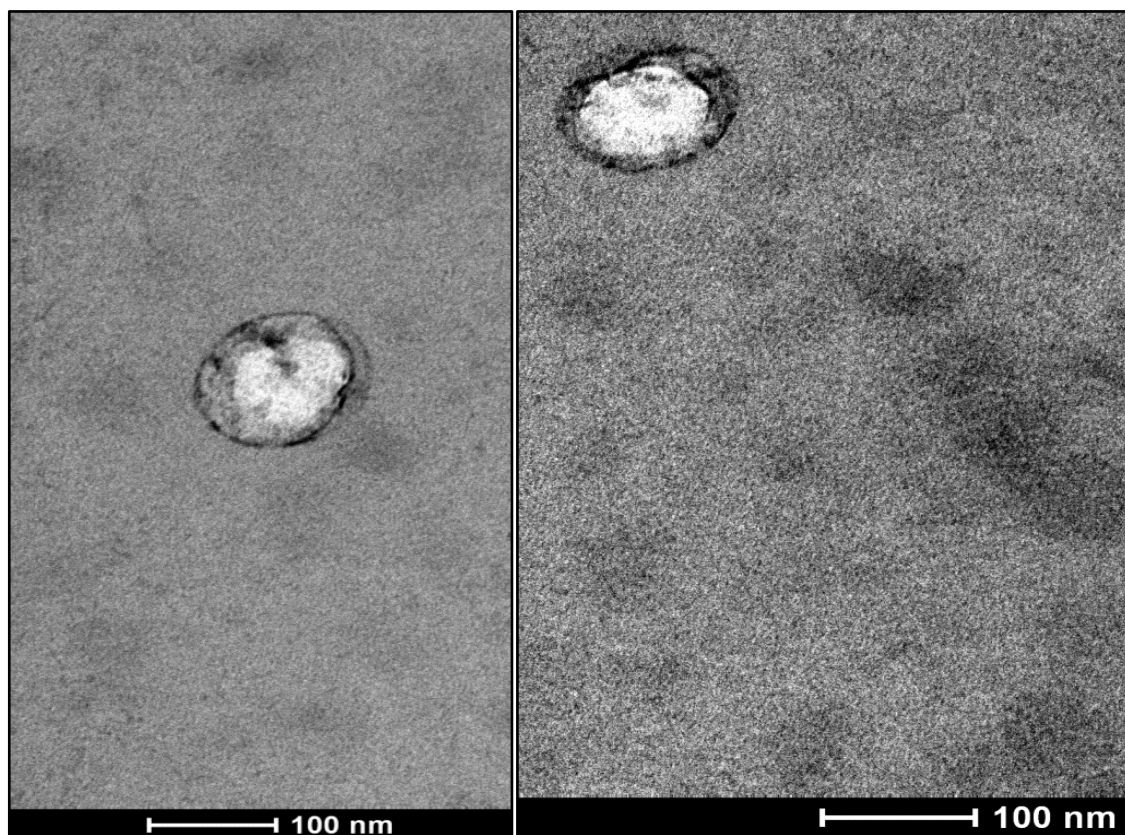
5.2.3. Corpos Lamelares

Não foi possível realizar a contagem dos corpos lamelares no contador automático de partículas. Foram realizados sucessivos testes com amostras refrigeradas e congeladas, utilizando a metodologia proposta para contagem no analisador automático. Foram feitas tentativas em dois aparelhos de marcas e modelos diferentes, de dois laboratórios distintos (humano e veterinário), e todos resultaram em leitura próxima a zero. Além da leitura com resultado zero, muitas vezes o aparelho obstruía devido ao alto grau de viscosidade e presença de muco nas amostras.

Desta forma, optou-se pela realização da microscopia eletrônica para verificar a existência dos corpos lamelares no líquido amniótico dos bovinos, uma vez que não havia trabalhos descrevendo a estrutura nessa espécie. Castagnetti et. al (2007), avaliando a maturidade pulmonar de potros recém-nascidos pela análise do líquido amniótico por microscopia eletrônica, relataram que os corpos lamelares mostravam-se como estruturas compostas por várias lamelas concêntricas, com diâmetro variando de 1,6 a 3,3 μ m, sendo a metodologia do contador de partículas aplicável na espécie equina.

Após a realização da microscopia eletrônica de transmissão do líquido amniótico em busca da caracterização dos corpos lamelares de bovinos, constatou-se que estas estruturas apresentam aproximadamente 130nm de diâmetro e a aparência demonstrada na Figura 2.

FIGURA 2. Fotomicrografias de corpos lamelares presentes em líquido amniótico obtido no momento do parto na espécie bovina através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.



Com isso, o presente estudo obteve a caracterização morfológica dos corpos lamelares da espécie bovina, ainda inédita na literatura. Sendo essas estruturas diminutas, confirmou-se ser impossível a sua observação em microscopia óptica, comprovando que os corpos lamelares do líquido amniótico de vacas são muito menores que os de seres humanos e equinos, porém semelhantes aos de ovinos (SOUZA, 2014). Este fato explica, portanto, as frustradas tentativas da quantificação dos corpos lamelares por meio de contadores automáticos de partículas.

Todavia, não foi possível sua contagem no microscópio eletrônico porque poucos corpos lamelares são encontrados em cada grade de processamento da amostra, devido à pequena porção de LA utilizada para a realização do exame. Possivelmente, pela armazenagem do LA e pela característica dos corpos lamelares de desenrolar dentro dos alvéolos, de maneira a formar o

filme de surfactante na interface ar-líquido, não foi possível observar tantas lamelas concêntricas nos corpos lamelares encontrados, sendo indicado para pesquisa posterior o estudo destas estruturas dentro do pneumócito do tipo 2, ainda no parênquima pulmonar, conforme as imagens B e C da Figura 1.

5.2.4. Resultados das Citologias

Os resultados de celularidade com a coloração do Azul de Nilo estão apresentados na Tabela 4, e a aparência de uma célula azul (acidofílica), por esta técnica de coloração, está representada na Figura 3. Já os resultados de celularidade com a técnica de Hematoxilina-Shorr constam na Tabela 5, e a aparência de uma célula alaranjada (orangiofílica), nesta coloração, está representada na Figura 4.

TABELA 4. Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para células azuis e células alaranjadas obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos momento do parto, por meio da coloração com Azul de Nilo.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
Células Azuis	50	21	16-27	2,7	19	5	103
Células Alaranjadas	50	1,7	1,4-2,1	0,18	1,2	1	5

TABELA 5. Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para células azuis e células alaranjadas obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio da coloração Hematoxilina-Shorr.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
Células Azuis	50	19	18-21	0,8	5,7	4	28
Células Alaranjadas	50	81	79-82	0,8	5,7	28	96

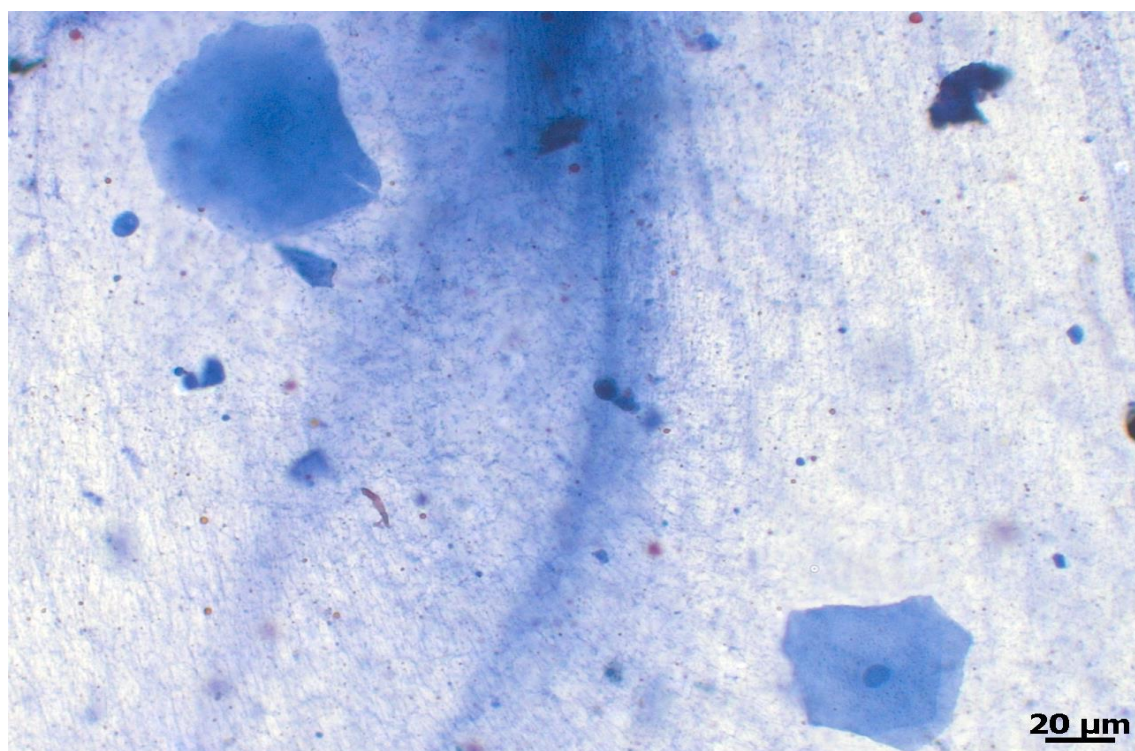


FIGURA 3. Morfologia de célula acidofílica (célula azul) obtida por meio de microscopia óptica da citologia do líquido amniótico corado com Azul de Nilo.

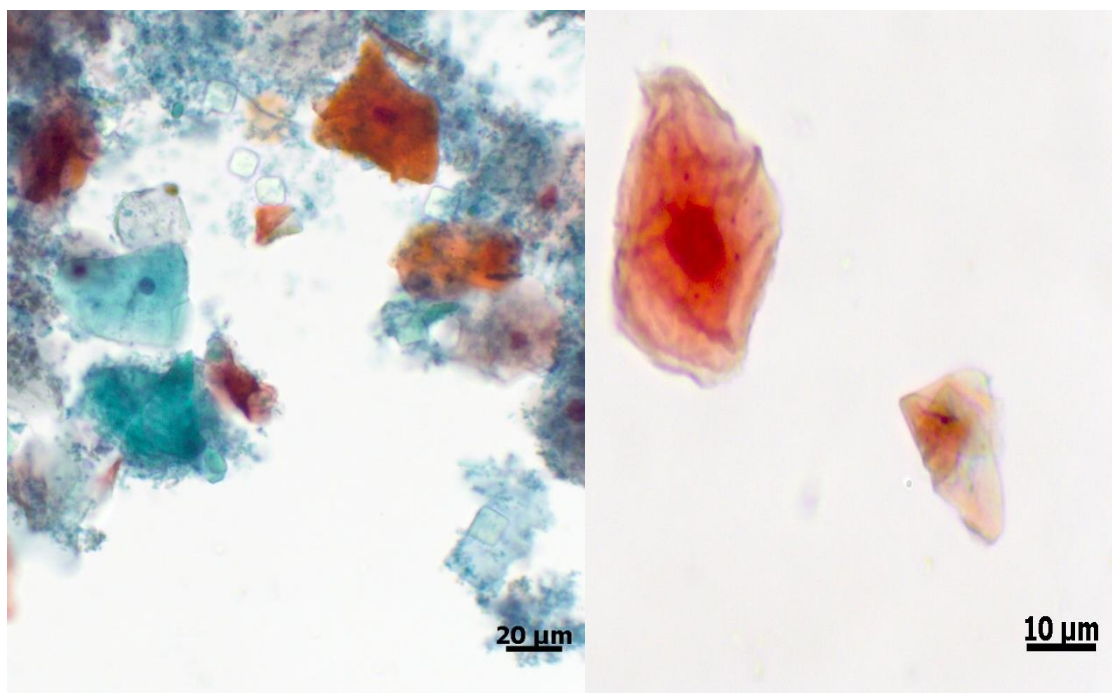


FIGURA 4. Morfologia de célula orangiofílica (célula alaranjada) obtida por meio de microscopia óptica da citologia do líquido amniótico corado com Hematoxilina-Shorr.

Os resultados das porcentagens de células orangiofílicas em cada tipo de coloração (Azul de Nilo x Hematoxilina-Shorr) estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Resultados da estatística descritiva compreendendo número de amostras (N), médias, desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para proporções entre células alaranjadas e azuis (L:A) obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio das colorações com Azul de Nilo e Hematoxilina-Shorr.

Variável	N	Média	DP	Mín.	Máx.
Proporção L: A (Azul de Nilo)	50	8%	2%	4%	16%
Proporção L: A (Hematoxilina-Shorr)	50	80%	5%	72%	96%

Não houve correlação entre as proporções das diferentes colorações das células (coeficiente de Pearson= -0.14), indicando que as duas metodologias não refletem entre si seus resultados. Assim, foi necessário escolher qual das duas metodologias foi mais adequada para avaliar a maturidade fetal em bovinos.

Na espécie humana já está padronizada a proporção de células alaranjadas no fluido amniótico ao final da gestação, representando de 50 a 95% da população celular (SOUZA et al., 2000). Assim, a alta proporção de células orangiofílicas é indicativa de maturidade fetal.

Com isso, a citologia utilizando a coloração do Azul de Nilo não se mostrou satisfatória, pois mesmo bezerros maduros apresentaram baixa porcentagem dessas células, em média com taxa de 8% (Tab. 6). Este achado corrobora com os resultados de Moya (2005) que trabalhou com bovinos e de Martins e Prestes (2003), em seu estudo com líquido amniótico de cadelas. Estes autores, concordando com o encontrado no presente estudo, verificaram que a coloração através do método de Hematoxilina-Shorr apresenta melhores resultados, pois permite observar a crescente proporção de células alaranjadas no final da gestação. Neste trabalho, foi encontrada porcentagem dez vezes maior do que aquela obtida com uso da técnica de coloração com Azul de Nilo, ou seja, em média, 80% da população celular do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca hípidos e a termo foi composta por células orangiofílicas (Tab. 6), o que evidencia que a técnica de Hematoxilina-Shorr, realmente mais trabalhosa e demorada por conter várias etapas de execução do que a coloração com Azul de Nilo, é a mais adequada para predizer a maturidade fetal na espécie bovina.

6. CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento, pode-se concluir que:

- I) O líquido amniótico do bezerro da Raça Holandesa Preta e Branca, a termo, hígido e maduro apresenta coloração clara e é turvo, podendo apresentar vários graus de viscosidade e presença ou ausência de grumos.
- II) O teste de Clements pode ser adaptado à espécie bovina com o uso exclusivo de 3mL de líquido amniótico adicionados a 1mL de etanol 95%, sem acréscimo de solução fisiológica. Bezerros maduros terão teste positivo, com formação de anel completo de bolhas nessas condições de diluição.
- III) A metodologia de CCL em contador automático não pode ser aplicada devido ao pequeno tamanho do corpo lamelar na espécie bovina.
- IV) A citologia com coloração pelo Azul de Nilo não é satisfatória na espécie bovina para predizer a maturidade fetal, diferentemente daquela pela Hematoxilina–Shorr, que se mostrou um método eficiente e capaz de substituir o Azul de Nilo para prever o grau de maturidade fetal de bezerros através da contagem das células orangiofílicas, que assumem grande proporção no final da gestação.
- V) Medidas de comprimento de coluna e amplitude torácica são úteis para o clínico que deseja avaliar a maturidade fetal, dentro de um conjunto de ferramentas que podem ser utilizadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho estabeleceu parâmetros de maturidade fetal e pulmonar ainda desconhecidos para a espécie bovina, o que será útil para o clínico que deseja avaliar neonatos de risco. Animais de alto valor econômico e genético são frequentemente acometidos pela SAR e, a partir do diagnóstico precoce da imaturidade do recém-nascido, medidas terapêuticas mais eficazes poderão ser tomadas, evitando óbitos e sequelas por lesões pulmonares acentuadas.

Para que este estudo se torne mais abrangente, será necessária a comparação dos dados obtidos no presente trabalho com as características do líquido amniótico de fetos prematuros, principalmente os de terço final de gestação. Assim, gestações de risco poderão ser monitoradas com segurança e o clínico terá em mãos parâmetros objetivos que o auxiliarão a indicar indução do parto ou até mesmo uso de fármacos que acelerem a maturação pulmonar do feto.

Além disso, dados de celularidade do líquido amniótico e de morfologia das estruturas carreadoras de surfactante (corpos lamelares), até então pouco estabelecidos para a espécie, são importantes para a formação do conhecimento básico sobre o amadurecimento fetal, e mais estudos nessa área são necessários nas diferentes espécies animais, de maneira que a Neonatologia Veterinária possa se igualar em evolução de conhecimentos já estabelecidos na Medicina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL AAL D.E., ELKHIRSHY A.A., ATWA S., EL-KABSH M.Y. Lamellar body count as a predictor of neonatal lung maturity in high-risk pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet.* 89(1):19-25. 2005.
- AMORIM, M. M. R., FAÚNDES, A., SANTOS, L. C., AZEVEDO, E. Acurácia do Teste de Clements para avaliação da maturidade pulmonar fetal em gestantes com doença hipertensiva específica da gestação. *RGO* 20(5):253-260. 1998.
- AVERY M.E.; MEAD J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child.* 97(5, Part 1):517-23. 1959.
- BARBOSA, F.P.; PEDROSO, A.F.; NOVO, M.L.A. *Embrapa: Produção de leite no Sudeste do Brasil.* 2009. Disponível em: [peppembrapahttp://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/importancia.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/importancia.html) Acesso em: 15/09/2014.
- BARRETO, C.S.; PRESTES, N.C.; SOUZA, F.F.; SANTOS, R.V.; DE VITA, B.; MATAYOSHI, P.M.; LEAL, L.S. Uso do teste de clements modificado e densidade óptica do líquido amniótico e alantoideano para avaliação da maturidade pulmonar em cães. *Veterinária e Zootecnia.* 2011.
- BELFORT, P. & ORLAND, O. *Medicina perinatal.* São Paulo: Manole. p. 39-45. 1993.
- BENESI, F.J. Síndrome da asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação crítica. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia*, v.16, n.1, p.38-48, 1993.
- BIRGEL JUNIOR, E.H.; MEIRELLES, F.V.; MAIORKA, P.C.; KUBRUSLY, F.S.; OLLHOFF, R.D. Medicina interna de bezerros clonados. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP.* São Paulo. v.9. n.1. p.24-31. 2011.
- BITTAR, R. Doenças da Membrana Hialina. *Manual de Neonatologia.* 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- BLEUL, U. Respiratory distress syndrome in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* v. 25, n.1, p.179-193. 2009.

BONGSO, T.A.; BASRUR, P.K. Cytology of bovine fetal fluids. *Can. J. Comp. Med.*, v.41, n. 3, p. 287-293. 1977.

BORN E. *Untersuchungen über den Einfluss der Schnittenbindung auf die Vitalität neugeborener Kälber*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover. 47p. 1981.

CAMPANA, S. G.; CHÁVEZ, J. H., HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, v.39, n.3, p. 215-218. 2003.

CASTAGNETTI, C. et al. Evaluation of lung maturity by amniotic fluid analysis in equine neonate. *Theriogenology* 67 (2007) 1455–1462.

CLEMENTS, J. A.; PLATZKER, A. C.G.; TIERNEY, D. F.. Assessment of the risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *New England Journal of Medicine*. v. 286, p.1077-1081. 1972.

COSTA S.H.M.; RAMOS J.G.L.; PILLA C.; CUNHA FILHO S.L. Avaliação da maturidade pulmonar fetal. In: FREITAS, F.; COSTA, S.H.M.; RAMOS, J.G.L.; MAGALHÃES, J.Á.; *Rotinas em Obstetrícia*, 4ed. Porto Alegre: Artmed. p.152-60. 2001.

DEROCHE M.E.; INGARDIA C.J.; GUERETTE P.J.; WU A.H.; LASALA C.A., MANDAVILLI S.R. The use of lamellar body counts to predict fetal lung maturity in pregnancies complicated by diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 187(4):908-12. 2002.

DOHOO, I., W. MARTIN, & H. STRYHN. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2ed. Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá. 2010.

DUBIN, S. B. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clinical Chemistry*. v.35, n.4, p.612-616.1989.

DWYER, C.M. The welfare of the neonatal lamb. *Small Rum. Res.*, v.76, p.31-41, 2008.

- EIGENMANN, U.E.J.; SCHOON, H.A.; JAHN, D.; GRUNERT, E. Neonatal respiratory distress syndrome in the calf. *Veterinary Record*. v. 11, p.141-144. 1984.
- FEITOSA, F.L.F.; BENESI, F.J. . Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos. In: *Semiologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: ROCA, 2014, v. 1, p. 69-97
- FIELD, N.T. Current status of amniotic fluid tests of fetal maturity. *Clin. Obstet. Gynecol.* v.40, n.2, p.366-386, 1997.
- GIL, B. M. K.; SOUZA, E.;SILVA, C. A. J.; FIGUEIREDO, C.P. Avaliação da maturidade pulmonar fetal pela contagem dos corpos lamelares no líquido amniótico. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v. 32, n.3, p. 112-117. 2010.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole. 513p. 2004.
- JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E.S.E. Gestação, Fisiologia Pré-natal e Parto. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri: Manole, p. 141-155, 2004.
- JOBE, A.; IKEGAMI, M.; JACOBS, H.; JONES, S.; CONAWAY, D. Permeability of premature lamb lungs to protein and the effect of surfactant on that permeability. *J. Appl. Physiol.* v. 55, p. 169-76, 1983
- JOHANSON JM, BERGER PJ. Birth weight as a predictor of calving ease and perinatal mortality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. v.86, p.3745–3755. 2003.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. A histologia e seus métodos de estudo. In: *Histologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-18. 1999.
- KJELDSBERG,C.; KNIGHT, J. Body fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serous and synovial fluids. In: *American Society of Clinical Pathologist*. 3. ed. Chicago: Theid, 387 p. 1993.
- KLEIN, B.G. *Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária*. 5ª. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2014, 608p.

KNOTTENBELT, D.; HOLDSTOCK, N.; MADIGAN, J. E. *Equine neonatology*. London:Elsevier; 2004.

LISBÔA J.A.N., BENESI F.J., LELAL M.L.R., TEIXEIRA C.M.C. 2002. Efeito da idade sobre o equilíbrio ácido básico de bezerras sadias no primeiro mês de vida. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 39:136-142.

LJUBIC V.; RADUNOVIC N.; STEFANOVIC A.; OPALIC J. Quantitative analysis of lamellar bodies in amniotic fluid as fetal pulmonary maturity indicator. *Vojnosanit Pregl.* 66(2):113-5. 2009.

LOBATO, G. *Maturidade pulmonar fetal*. 2011. Disponível em: <<http://www.medcenter.com/medscape/content.aspx?id=3501&langtype=1046>> . Acesso em: 25/11/2012.

LUZ, V.; FERREIRA, R. A.; NETO, J. A. S. Avaliação da maturidade pulmonar através da análise comparativa do teste de clements, contagem de corpos lamelares e relação surfactante/albumina no líquido amniótico. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. v. 32, n.3, p.37-412. 2003.

MARTINS, L.R. & PRESTES, N.C. Ensaio sobre exame citológico do líquido amniótico de cadelas colhido no momento da cesariana. *ARS Veterinária*. 2003.

MASSIP, J.; MOCSY, J. *Tratado de diagnóstico clínico de las enfermedades internas de los animales domésticos*. 3ed. Barcelona: Labor, 1965. 675p.

MAURER-SCHWEISER, H.; WILHELM, U.; WALSER, K. Blutgase und Saure-Basenhaushalt bei lebensfrischen Kalbern in den ersten 24 Lebensstunden. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, v.90, n.10, p. 192-6, 1977.

MEE, J.F. Prevalence and risk factors for distocia in dairy cattle: a review. *The Veterinary Journal*. v.176. p.93-101. 2008.

MIES FILHO, A. *Inseminação Artificial*. 6 a edição. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.

MOURA, M.R.P.; LANNA, L.L.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Perfil citológico dos líquidos amniótico e alantoidiano nos terços inicial, médio e final da gestação na vaca. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.61, n.6, p.1443-1445, dez. 2009.

MOYA, C. F. *Tipificação citológica do líquido amniótico de bezerros oriundos de produção in vitro, transferência de embrião e inseminação artificial no momento do parto*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu. 2005.

NEERHOF M.G., HANEY E.I., SILVER R.K., ASHWOOD E.R., LEE I., PIAZZE J.J. Lamellar body counts compared with traditional phospholipids analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol* 2001;97:305- 9.

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 da acordo com a idade gestacional. *Revista da Associação Médica do Brasil*. v. 47, n. 4, p. 346-351. 2001.

OBLADEN, M. History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate*. 2005;87(4):308-16.

REBELLO, C.M.; IKEGAMI, M.; POLK, D.H.; JOBE, A.H. Postnatal lung responses and surfactant function after fetal or maternal corticosteroid treatment of preterm lambs. *Journal of Applied Physiology*. v.80, p.1674-1680. 1996.

ROY, J.H.B. Management of health. In: ROY, J.H.B. (Ed.) *The calf*. 5.ed. England: Butterworths, 1990. v.1, 258p.

SEBRAE. 2014. *Cartilha de orientações para produtores de leite*. Disponível em: <http://www.agenciasebrae.com.br/sites/asn/uf/NA/Cartilha-traz-orientações-para-produtores-de-leite>. Acesso em: 15/09/2014.

SEEDS, A.E. Current concepts of amniotic fluid dynamics. *Am J Obstet Gynecol*. 1980 Nov 1;138(5):575-86.

SMITH, B. P. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3ª. ed. Manole: Barueri, 2006, 1728p.

SOUZA, C.; PRESTES, N. C.; LOPES, R. S. Pesquisa de células orangiofílicas e aplicação do teste de Clements no fluido amniótico de ovinos (*Ovis aries*), colhidos em matadouro, em vários estágios da gestação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2000, São Paulo. *Anais*. São Paulo, p. 29. 2000.

SOUZA, N. C. Avaliação da maturidade pulmonar de cordeiros nascidos a termo e prematuros pela análise citológica, teste de Clements e contagem de corpos lamelares do líquido amniótico (Dissertação). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária. Araçatuba: 2014.

STAHLMAN, M.T, et al. Lamellar body in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. Vol. 80, No. 3, p. 395, 2000.

TABORDA, W.; ALENCAR JUNIOR, C. A.; BERTINI, A. M. Avaliação da maturidade fetal. In: BENZECRY, R.; OLIVEIRA, H.C.; LEMGRUBER, I. *Tratado de Obstetrícia FEBRASGO*. Rio de Janeiro: Revinter. p.873-885. 2000.

TOQUETTI, R. C.; GUERRA, R. R.; AMBROSIO, C. E.; SANTOS, J. M.; FAVARON, P. O.; FRANCIOLLI, A.L.R.; ALBERTO, M.V.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A. Morfologia e funcionalidade do pneumócito tipo II e sua relação e variação com a idade gestacional em bovinos. *Ciência Rural*, v.39, n.8, p.2470-2477. 2009.

VAALA, W. E.; HOUSE, J. K. O período periparto. In: SMITH, B. P. (Ed). *Medicina interna de grandes animais*. 3.ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 257-265.

VASSALO, F.G.; PETERNELLI SILVA, L.; LOURENÇO, M.L.G.; CHIACCHIO, S.B. Escore de Apgar: história e importância na medicina veterinária. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.38, n.1, p.54-59, jan./mar. 2014.

VIEIRA, A. C. G. *Contagem de corpos lamelares na secreção traqueal de recém-nascidos para avaliação da maturidade pulmonar*. Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. 2010.

WALSER, K.; MAURER-SCHWEISER, H. Acidosis and clinical state in depressed calves. In: HOFFMAN, B.; MASON, I.L.; SCHMIDT, J. Calving problems and early viability of the calf. *Current topics in veterinary medicine and animal science*. 1979. v.4. p.551-63.

WHITSETT, J.A., PRYHUBER G.S., RICE W.R., WARNER B.B., WERT S.E. Acute respiratory disorder. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, editors. *Neonatology: pathophysiology and management of the newborn*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 1999. p.494-7.

WOLF, A.; GABALDI, S. H. Ultra-sonographic accompaniment of gestation in large animals – part II. *Ciên. Agr. Saúde*. FEA. Andradina. v. 2. n. 2. jul-dez 2002. p 84-89.

WONG, K.A et al. Pulmonary Vagal innervation is required to establish adequate alveolar ventilation in the newborn lamb. *J Appl Physiol* 85:849-859, 1998.

Zogno M.A., Miglino M.A. & Oliveira M.F. 2004. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de mocó (*Kerodon rupestris*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41(4):226-235.

9. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho Científico: “Avaliação da maturidade pulmonar através da análise do líquido amniótico em neonatos bovinos”

A ser enviado para a revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”

ISSN: 0100-736X

Normas para publicação disponível em:

<http://www.pvb.com.br/index.php?link=home>

Normas para Publicação:

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail jurgen.dobereiner@pvb.com.br, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS;

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos, isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www. pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados

na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas;

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Trabalho

Avaliação da maturidade pulmonar através da análise do líquido amniótico no neonato bovino¹

Gabriela N. Dantas^{*2}; Bianca P. Santarosa²; Maria L. G. Lourenço²; Simone B. Chiacchio²;
Fernando J. Benesi³; Roberto C. Gonçalves²

ABSTRACT.- Dantas G.N., Santarosa B.P., Lourenço M.L.G., Chiacchio S.B., Benesi F.J., Gonçalves R.C. 2015. **[Evaluation of lung maturity by amniotic fluid analysis in bovine neonate.]** Avaliação da maturidade pulmonar através da análise do líquido amniótico em neonatos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: gndantas@fmvz.unesp.br.

Considering the representativeness of dairy cattle in our country, the concern about the mortality rates of the animals increases each time. Regarding to calf mortality, the Respiratory Distress Syndrome (RDS) has an important relevance during the neonatal period, and it is present in immature lungs. The amniotic fluid is in direct contact with the fetus, and it is able to offer evidence about his maturity. The aim of this study was to standardize the characteristics of the amniotic fluid – color, aspect, viscosity, lamellar body and presence of surfactant evaluation by the Clements test and cytology – of term-born, mature and healthy calves. There were used 50 Black and White Holstein calves, which mothers were observed at calving in order to collect the amniotic fluid by puncture in the moment of exposure of the fetal membrane through the vaginal canal. The amniotic fluid had a clear color and it was hazy because of the different degrees of viscosity and the presence or absence of clots. The Clements test could be adapted to the bovine species by the modification consisting in the addition of 3mL of amniotic fluid and 1mL of 95% ethanol. The methodology of the lamellar body count by the automated particle counter is not applicable for the bovine because of the small size of their lamellar body. The Nile Blue staining is unsatisfactory on predicting fetal maturity on the bovine species, different from cytology using Hematoxylin-Shorr stain. The cell stained orange counting, cells which are found in great amounts at the end of pregnancy. The present study established new parameters for evaluation of fetal and pulmonary maturity in the bovine species.

INDEX TERMS: calf; fetal maturity; lamellar bodies; Clements Test; amniotic fluid cytology.

RESUMO.- O objetivo desse estudo foi reunir novos dados práticos sobre a avaliação da maturidade pulmonar em neonatos bovinos, padronizando as características do líquido amniótico de bezerras maduros e hígidos, o que proporcionará a oportunidade de tratamento precoce dos animais prematuros, evitando prejuízos econômicos, principalmente quando consideramos os animais de alto valor genético. Amostras de líquido amniótico foram coletadas de 50 vacas da Raça Holandesa Preta e Branca. Corpos lamelares foram identificados por microscopia eletrônica de transmissão como estruturas de tamanho aproximado de 130nm, o que impede sua contagem em analisadores automáticos. O teste de Clements sofreu adaptações de técnica e se mostrou viável com a diluição

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

Dissertação de Mestrado da primeira autora. Bolsa de Mestrado (Proc. 2012/24836-8) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

² Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autora para correspondência: gndantas@fmvz.unesp.br

³ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

de 3mL de líquido amniótico em 1mL de etanol a 95%. A citologia utilizando o método de Hematoxilina-Shorr, diferentemente do teste de Azul de Nilo, foi eficaz na identificação das células orangiofílicas, indicativas de maturidade fetal. Esses métodos mostraram-se originais e úteis ferramentas para a avaliação de maturidade pulmonar na espécie bovina, porém estudos com bezerros prematuros ainda são necessários.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bezerro; maturidade fetal; corpos lamelares; teste de Clements; citologia do líquido amniótico.

INTRODUÇÃO

A maturação do pulmão ao nascimento coincide com a maturidade do feto e apresenta direta relação com a produção de surfactante (EIGENMANN et al. 1984). A função do surfactante é reduzir a tensão superficial na interface ar-líquido dos alvéolos, prevenindo seu colapso e facilitando o trabalho respiratório do recém-nascido (REBELLO et al. 1996). A consequência da imaturidade pulmonar é a Síndrome da Angústia Respiratória (SAR), ou Asfixia Neonatal, que acarreta prejuízos econômicos e genéticos à criação, devido ao óbito dos animais (BENESI 1993).

Na última década foram realizados estudos para esclarecer a eficácia de testes para a determinação do estágio de desenvolvimento pulmonar, porém grande parte deles com aplicação à espécie humana (GIL et al. 2010). Pesquisas com este escopo são escassas na Medicina Veterinária, e a maioria destes dados não existe para a espécie bovina.

O líquido amniótico é importante componente do ambiente intrauterino e fornece inúmeras informações sobre a saúde e maturação do feto por estar em contato direto com seu trato respiratório e pele, refletindo assim a quantidade de surfactante presente e o tipo celular predominante em seu epitélio (CAMPANA et al. 2003).

Os testes utilizados para avaliar a maturação pulmonar e fetal a partir de amostras de líquido amniótico podem ser resumidos da seguinte forma: coloração celular com Sulfato de Azul de Nilo ou com Hematoxilina-Shorr, que mostram a proporção entre as células lipídicas coradas de laranja e, por isso, chamadas de orangiofílicas, e as cianofílicas ou acidofílicas, indicativas de imaturidade (MARTINS & PRESTES, 2003); Teste de Clements, método qualitativo que indica, pela formação de anel de bolhas completo ou incompleto, se existe ou não, respectivamente, surfactante em quantidade adequada no líquido amniótico (BARRETO et al. 2011); contagem de corpos lamelares, os reservatórios de fosfolípidios, componentes do surfactante pulmonar, presentes no líquido amniótico, que é realizada em contador hematológico automático, no canal de contagem de plaquetas, devido ao tamanho equivalente dessas estruturas (GIL et al. 2010). Para que a contagem de corpos lamelares seja aplicada à espécie bovina, eles têm que apresentar necessariamente o mesmo tamanho das plaquetas, de maneira que o analisador hematológico consiga realizar o exame. Como o tamanho e a aparência dessas estruturas, em bovinos, não são conhecidos, se faz necessário realizar microscopia eletrônica em líquido amniótico da espécie bovina em busca do reconhecimento inicial dos corpos lamelares para depois testar a aplicabilidade do teste.

Desta forma, este trabalho visou contribuir para a validação e o aperfeiçoamento de técnicas de mensuração do grau de maturidade pulmonar em bovinos, priorizando testes de aplicação prática na rotina clínica. Assim, um estudo que padronize as características do líquido amniótico de bezerros maduros proporcionará a oportunidade de tratamento precoce dos animais prematuros, evitando prejuízos econômicos ao criador, principalmente no que se refere aos animais de alto valor genético, produtos de fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem. Além disso, entender e padronizar indicadores da maturação pulmonar fisiológica por meio dos testes de diagnósticos supracitados contribuirá para o entendimento da patogênese da SAR na espécie bovina, pré-requisito necessário para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas que amenizem ou previnam lesões pulmonares e a morte de animais em consequência da síndrome.

O objetivo deste trabalho foi padronizar as características do líquido amniótico quanto à coloração, aspecto, viscosidade, presença de surfactante pelo teste de Clements, avaliação dos corpos lamelares e citologia de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca nascidos maduros, a termo e hígidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 50 bezerros recém-nascidos sadios da raça Holandesa Preta e Branca (30 fêmeas e 20 machos) provenientes de propriedade localizada em Descalvado-SP e oriundos de inseminação artificial. As fêmeas em idade gestacional avançada eram mantidas em regime semi-intensivo no Setor de Maternidade da fazenda. As coletas foram realizadas entre os meses de fevereiro e junho de 2014. Todos os partos foram acompanhados. Duas vezes ao dia os piquetes eram inspecionados em busca de animais com sinais de parto iminente, e vacas que tinham data de parto prevista para aquela semana eram separadas do lote. Os animais selecionados eram mantidos em baias de parição onde a equipe de apoio os monitorava durante as 24 horas do dia.

Para que os recém-nascidos fossem classificados como hígidos e maduros, eles foram avaliados ao nascimento considerando os seguintes aspectos: duração da gestação e saúde da mãe; tamanho do recém-nascido; triagem pelo escore Apgar (BORN 1981) no primeiro minuto de vida com seleção apenas de neonatos com pontuação 7 ou 8; exame físico geral (FEITOSA & BENESI 2014); e mensuração de pH sanguíneo pela punção da veia jugular em hemogasômetro portátil (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA). Qualquer indício de prematuridade, imaturidade, doença, baixa vitalidade ou contaminação do líquido amniótico por mecônio foram fatores de exclusão neste trabalho.

As amostras de líquido amniótico (20mL) foram coletadas durante o trabalho de parto com auxílio de seringa de 20mL e agulha 40X12 por punção e aspiração da bolsa amniótica no momento em que ela se expunha no canal do parto. O volume colhido foi transferido para tubo seco de polietileno com capacidade de 30mL, e as provas imediatas foram realizadas (análise de coloração e aspecto, e Teste de Clements). O material restante foi transferido para tubos de *Eppendorf* identificados, que foram mantidos a -20°C até a realização dos demais testes (análise dos corpos lamelares e citologia).

Para a análise de coloração e aspecto, o líquido foi classificado quanto à coloração (clara, amarelada ou avermelhada), aspecto (turvo ou não) e viscosidade (pouco viscoso/+, viscoso/++ ou muito viscoso/+++). Além disso, foi registrada a presença ou ausência de grumos. Foram realizados o Teste de Clements original (CLEMENTS et al. 1972), o modificado por Barreto (BARRETO et al. 2011) e técnica adaptada pelos autores deste trabalho, que constituiu na mistura de 3mL da amostra de líquido amniótico com 1mL de etanol a 95% e realização das etapas posteriores de forma semelhante ao teste de Clements original. A técnica utilizada para a Contagem de Corpos Lamelares foi a padronizada para contadores automáticos (NEERHOF et al. 2001). Para o processamento da microscopia eletrônica de transmissão, o material coletado foi fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído a 8%, glutraldeído a 25% e tampão fosfato 0,2M em pH 7,3, na proporção 5:1:4) e mantido à temperatura ambiente por quatro horas. Após o tempo de fixação, o material foi refrigerado a 4°C até seu processamento, realizado em grade de cobre com película de carbono de 150-200 mesh e coloração da película com acetato de uranila a 4%. O exame do material foi realizado em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai®. Para a realização da citologia utilizando o Azul de Nilo, foi adicionada uma gota (50µl) do líquido amniótico e uma gota do corante Azul de Nilo a 0,1% sobre a lâmina, misturando-as em seguida. Após cobrir com lamínula, foi realizada a leitura em microscópio óptico. Contaram-se cinco campos e a frequência absoluta e relativa de cada tipo celular (orangiofílicas e cianofílicas) foi registrada. Já para a coloração utilizando a técnica de Hematoxilina-Shorr, utilizou-se a metodologia proposta por Moya (2005), e após o preparo da lâmina, foi realizada a leitura semelhante à do método do Azul de Nilo.

Com relação a análise estatística, todas as variáveis tiveram sua distribuição analisada para verificação de normalidade. As variáveis contínuas foram submetidas inicialmente a estatísticas descritivas. Distribuições de frequência foram produzidas para apresentar os resultados das variáveis nominais e ordinais. Para comparar as médias do pH sanguíneo entre animais provenientes de partos distócico e eutócico, utilizou-se o “teste t” não pareado. Para estimar a correlação entre a proporção de células alaranjadas e azuis nos dois tipos de colorações utilizados neste trabalho, utilizou-se o “coeficiente de Pearson”. As análises foram realizadas em nível de significância estatística de 5%.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp Botucatu (Protocolo 241/2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 50 animais estudados, 20 nasceram por parto eutócico (40%) e os outros 30 bezerros (60%) por meio de tração forçada leve (apenas uma pessoa) com auxílio de correntes obstétricas, caso a bolsa amniótica estivesse rompida a um período superior a 2 horas. Todas as distocias observadas foram de origem fetal: fetos relativamente grandes em relação à mãe (70%) ou com estática anormal (30%), representada por apresentação posterior, flexão de membros torácicos ou do pescoço. Uma hipótese que explicaria esse fato seria a de ter havido, no período experimental, grande número de partições de novilhas (primíparas), que reconhecidamente tem menor tamanho de pelve e maior incidência de partos distócicos (JAINUDEEN & HAFEZ 2004).

Durante o trabalho de parto instalam-se distúrbios na circulação sanguínea uteroplacentária em função das contrações do miométrio, resultando em menor aporte de oxigênio para o feto (WALSER & MAURER-SCHWEISER 1979). Assim, no caso de partos demorados, essa deficiência na oxigenação do feto é maior, predispondo o neonato a graus mais acentuados de acidose com consequente diminuição de vitalidade. A relação lógica entre distocia e o prejuízo da circulação materno-fetal foi motivo de discussão no estudo de Massip & Mocsy (1965), o qual concluiu que no caso de partos distócicos os bezerros apresentavam acidose mais pronunciada que animais oriundos de partos eutócicos, porém o comprometimento maior advinha de neonatos obtidos por cesariana de emergência. Porém, outros autores (MAURER-SCHWEISER et al. 1977), demonstraram que bezerros provenientes de partos espontâneos e bezerros com nascimento auxiliado por tração leve apresentam características de vitalidade e pH sanguíneo semelhantes. Devido à observação constante das vacas gestantes, os casos de distocia eram detectados precocemente e solucionados. Consequentemente, os animais experimentais não permaneceram longo tempo em distocia e não desenvolveram perda de vitalidade por possível acidose (Quadro 1).

Sabe-se que a síntese de surfactante é influenciada pelo pH, pela temperatura corporal e pela perfusão, sendo comprometida nos quadros de acidose (BITTAR 2010). Já foi comentado nos critérios de exclusão que os neonatos utilizados nesta pesquisa apresentaram temperatura retal e TPC, normais para a espécie, mostrando boa perfusão capilar. Não houve diferença estatística no pH dos animais provenientes de eutocia e distocia ($p=0.44$), o que permite considerá-los como um grupo homogêneo.

Das 50 amostras de líquido amniótico analisadas, 43 (86%) apresentaram coloração clara, cinco (10%) coloração amarelada e dois (4%) a coloração avermelhada. A cor clara é considerada como normal no líquido amniótico (ZOGNO et al. 2004). A cor amarela originou-se pela contaminação do líquido amniótico com o alantoideano no momento da coleta, pois uma grande quantidade era liberada, momentos antes da exposição do âmnio, ficando parte desse líquido no canal vaginal, embora para os tipos de análise realizados não houvesse influência nos resultados. Fortalece essa hipótese o fato de que nenhum animal nasceu tingido por mecônio descartando-se a contaminação do fluido amniótico por esta substância como causa da cor amarelada. A cor avermelhada ocorreu devido à contaminação por sangue no momento da punção, que às vezes atingia pequenos vasos da membrana amniótica.

Com relação ao aspecto, todas as amostras mostraram-se turvas, sendo que 13 delas (26%) apresentaram também grumos de coloração branca. Os resultados da classificação quanto à viscosidade distribuíram-se da seguinte forma: sete amostras pouco viscosas (+/14%), 30 amostras com viscosidade intermediária (+/60%) e 13 amostras muito viscosas (+++/26%). De acordo com o protocolo adotado na Faculdade de Medicina de Botucatu, no qual o presente estudo se baseia, quando o líquido amniótico apresenta-se transparente e sem grumos é indício de imaturidade pulmonar, e o líquido turvo e viscoso, com grumos, deve ser proveniente de feto maduro. No entanto, em bezerros, não foi observada essa relação, visto que todos os animais estavam maduros e, mesmo assim, alguns apresentaram líquido amniótico pouco viscoso ou sem grumos.

Não houve amostras positivas no teste de Clements como originalmente proposto (CLEMENTS et al. 1972), e resultado igual foi obtido após a aplicação do teste de Clements modificado por Barreto (BARRETO et al. 2011), ou seja, todas as amostras de fluido amniótico foram negativas. Frente ao insucesso desses dois testes, adaptou-se novamente a metodologia e, a partir de sucessivas tentativas com quantidades crescentes de líquido amniótico, verificou-se que quando misturados 3mL de líquido amniótico com 1mL de etanol 95% exclusivamente, sem adição de solução fisiológica, as amostras formavam o anel completo de bolhas, indicando positividade do teste. Após esta modificação, 100% dos líquidos testados foram positivos, mostrando a aplicabilidade do teste modificado na espécie bovina, já que animais maduros terão teste positivo, nessas condições de diluição. Amostras de líquido amniótico de animais prematuros e com sinais

clínicos de SAR precisam ser testadas posteriormente, para que se confirme se a técnica adaptada (com a diluição de 3mL) será negativa em animais com deficiência na quantidade ou qualidade de surfactante produzido. Para isso, seria necessário adotar a técnica de amniocentese durante o período final da prenhez, já que a coleta de LA proveniente de matadouro não se mostra eficaz, provavelmente porque durante o processo de abate, o feto entra em sofrimento e contamina o líquido amniótico com mecônio, fazendo com que o Teste de Clements seja sempre falso positivo, independente da diluição. Este teste é particularmente interessante por se tratar de uma técnica simples e aplicável na rotina clínica, porém mais estudos são necessários para estabelecermos com maior precisão o ponto de corte na diluição entre animais maduros e prematuros.

Não foi possível realizar a contagem dos corpos lamelares no contador automático de partículas. Apesar de sucessivos testes com amostras refrigeradas e/ou congeladas, todos resultaram em leitura próxima a zero. Além disso, muitas vezes o aparelho obstruía devido ao alto grau de viscosidade e presença de muco nas amostras. Desta forma, optou-se pela realização da microscopia eletrônica de transmissão para verificar a existência dos corpos lamelares no líquido amniótico dos bovinos, uma vez que não havia trabalhos realizados descrevendo a estrutura nessa espécie. Castagnetti et. al (2007), avaliando a maturidade pulmonar de potros recém-nascidos pela análise do líquido amniótico por microscopia eletrônica, relataram que os corpos lamelares mostravam-se como estruturas compostas por várias lamelas concêntricas, com diâmetro variando de 1,6 a 3,3 μ m, sendo a metodologia do contador de partículas aplicável na espécie equina. Após a realização da microscopia eletrônica do líquido amniótico em busca da caracterização dos corpos lamelares de bovinos, constatou-se que estas estruturas apresentam aproximadamente 130nm de diâmetro e a aparência demonstrada na Figura 1. Com isso, caracterizou-se a morfologia dos corpos lamelares da espécie bovina, ainda inédita na literatura. Sendo essas estruturas diminutas, confirmou-se ser impossível a sua observação em microscopia óptica, comprovando que os corpos lamelares do líquido amniótico de vacas são muito menores que os de seres humanos e equinos. Este fato explica, portanto, as frustradas tentativas da quantificação dos corpos lamelares por meio de contadores automáticos de partículas. Como os corpos lamelares se desfazem quando excitados para recobrir o alvéolo de surfactante, o encontro de estruturas com lamelas concêntricas, como descrito na literatura, não foi possível. Assim, indica-se para pesquisa posterior o estudo destas estruturas ainda dentro do pneumócito.

Os resultados de celularidade com a coloração do Azul de Nilo e Hematoxilina-Shorr e suas proporções e morfologias, apresentados nas Figuras 2 e 3 e nos Quadros 2, 3 e 4 ilustram as células contadas e mostram que não houve correlação entre as proporções de células orangiofílicas entre as diferentes colorações estudadas (coeficiente de Pearson= -0.14), indicando que as duas metodologias não refletem entre si seus resultados. Em mulheres já está padronizada a proporção de células alaranjadas no fluido amniótico durante a gestação, representando de 50 a 95% da população celular (SOUZA et al. 2000). Assim, a alta proporção de células orangiofílicas é indicativa de maturidade fetal. Com isso, a citologia utilizando a coloração do Azul de Nilo não se mostrou satisfatória, pois mesmo bezerros maduros apresentaram baixa porcentagem dessas células, em média com taxa de 8%. Esse achado corrobora com os resultados de Moya (2005) que trabalhou com bovinos e de Martins e Prestes (2003) em seu estudo com líquido amniótico de cadelas. Neste trabalho foi encontrada porcentagem dez vezes maior do que aquela obtida com uso da técnica de coloração com Azul de Nilo, ou seja, em média 80% da população celular do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca hígdos e a termo foi composta por células orangiofílicas, o que evidencia que a técnica de Hematoxilina-Shorr, embora mais trabalhosa e demorada, é a mais adequada para predizer a maturidade fetal na espécie bovina.

Este trabalho estabeleceu parâmetros de maturidade fetal e pulmonares ainda desconhecidos para a espécie bovina, o que será útil para o clínico que deseja avaliar neonatos de risco. Animais de alto valor econômico e genético são frequentemente acometidos por SAR e, a partir do diagnóstico precoce da imaturidade do recém-nascido, medidas terapêuticas mais eficazes podem ser tomadas evitando óbitos e sequelas por lesões pulmonares acentuadas. Para que esse estudo se torne mais abrangente, será necessário comparar os dados obtidos no presente trabalho com as características do líquido amniótico em fetos prematuros, principalmente os de terço final de gestação. Assim, gestações de risco poderão ser monitoradas com segurança e o clínico terá em mãos parâmetros objetivos que o auxiliarão a indicar indução do parto ou até mesmo uso de fármacos que acelerem a maturação pulmonar do feto. Além disso, dados de celularidade do líquido amniótico e de morfologia das estruturas carreadoras de surfactante, até então pouco estabelecidos para a espécie, são importantes para a formação do conhecimento básico sobre o amadurecimento fetal, e mais estudos nessa área são necessários nas diferentes espécies animais, de maneira que a

Neonatologia Veterinária possa se igualar em evolução e conhecimento ao estabelecido na Medicina.

AGRADECIMENTOS

À FMVZ/UNESP-Botucatu, pela estrutura física e equipamentos utilizados para a realização do experimento. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela Bolsa de Mestrado concedida (Processo 2012/24836-8).

REFERÊNCIAS

- BARRETO, C.S.; PRESTES, N.C.; SOUZA, F.F.; SANTOS, R.V.; DE VITA, B.; MATAYOSHI, P.M.; LEAL, L.S. Uso do teste de clements modificado e densidade óptica do líquido amniótico e alantoideano para avaliação da maturidade pulmonar em cães. *Veterinária e Zootecnia*. 2011.
- BENESI, F.J. Síndrome da asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação crítica. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia*, v.16, n.1, p.38-48, 1993.
- BITTAR, R. Doenças da Membrana Hialina. *Manual de Neonatologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- BORN E. *Untersuchungen über den Einfluss der Schnittentbindung auf die Vitalität neugeborener Kälber*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover. 47p. 1981.
- CAMPANA, S. G.; CHÁVEZ, J. H., HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, v.39, n.3, p. 215-218. 2003.
- CASTAGNETTI, C. et al. Evaluation of lung maturity by amniotic fluid analysis in equine neonate. *Theriogenology* 67. 1455-1462. 2007.
- CLEMENTS, J. A.; PLATZKER, A. C.G.; TIERNEY, D. F.. Assessment of the risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *New England Journal of Medicine*. v. 286, p.1077-1081. 1972.
- EIGENMANN, U.E.J.; SCHOON, H.A.; JAHN, D.; GRUNERT, E. Neonatal respiratory distress syndrome in the calf. *Veterinary Record*. v. 11, p.141-144. 1984.
- FEITOSA, F.L.F. & BENESI, F.J. . Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos. In: *Semiologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: ROCA, v. 1, p. 69-97. 2014.
- GIL, B. M. K.; SOUZA, E.; SILVA, C. A. J.; FIGUEIREDO, C.P. Avaliação da maturidade pulmonar fetal pela contagem dos corpos lamelares no líquido amniótico. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v. 32, n.3, p. 112-117. 2010.
- JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E.S.E. Gestação, Fisiologia Pré-natal e Parto. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri: Manole, p. 141-155, 2004.
- MARTINS, L.R. & PRESTES, N.C. Ensaio sobre exame citológico do líquido amniótico de cadelas colhido no momento da cesariana. *ARS Veterinária*. 2003.
- MASSIP, J. & MOCSY, J. *Tratado de diagnóstico clínico de las enfermedades internas de los animales domésticos*. 3ed. Barcelona: Labor, 675p, 1965.
- MAURER-SCHWEISER, H.; WILHELM, U.; WALSER, K. Blutgase und Saure-Basenhaushalt bei lebensfrischen Kalbern in den ersten 24 Lebensstunden. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, v.90, n.10, p. 192-6, 1977.
- MOYA, C. F. *Tipificação citológica do líquido amniótico de bezerros oriundos de produção in vitro, transferência de embrião e inseminação artificial no momento do parto*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu. 2005.
- NEERHOF M.G., HANEY E.I., SILVER R.K., ASHWOOD E.R., LEE I., PIAZZE J.J. Lamellar body counts compared with traditional phospholipids analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol*; 97:305- 9. 2001.
- REBELLO, C.M.; IKEGAMI, M.; POLK, D.H.; JOBE, A.H. Postnatal lung responses and surfactant function after fetal or maternal corticosteroid treatment of preterm lambs. *Journal of Applied Physiology*. v.80, p.1674-1680. 1996.
- SOUZA, C.; PRESTES, N. C.; LOPES, R. S. Pesquisa de células orangiofílicas e aplicação do teste de Clements no fluido amniótico de ovinos (*Ovis aries*), colhidos em matadouro, em vários estágios da gestação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2000, São Paulo. *Anais*. São Paulo, p. 29. 2000.

WALSER, K.; MAURER-SCHWEISER, H. Acidosis and clinical state in depressed calves. In: HOFFMAN, B.; MASON, I.L.; SCHMIDT, J. Calving problems and early viability of the calf. *Current topics in veterinary medicine and animal science*. v.4. p.551-63. 1979.

ZOGNO M.A., MIGLINO M.A. & OLIVEIRA M.F. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de mocó (*Kerodon rupestris*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41(4):226-235. 2004.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Fotomicrografias de corpos lamelares presentes em líquido amniótico da espécie bovina obtido no momento, através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Fig. 2. Morfologia de célula acidofílica (célula azul) obtida por meio de microscopia óptica da citologia do líquido amniótico corado pela técnica do Azul de Nilo.

Fig. 3. Morfologia de célula orangiofílica (célula alaranjada) obtida por meio de microscopia óptica da citologia do líquido amniótico corado pela técnica de Hematoxilina-Shorr.

Os Quadros

Quadro 1. Número de amostras (N), médias, intervalo de confiança (IC 95%), erro padrão (EP), desvio padrão (DP), valor mínimo (Mín) e máximo (Máx) para o pH sanguíneo de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do nascimento: pH geral, pH dos animais nascidos por eutocia e pH dos animais nascidos por distocia.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
pH	50	7.22	7.20-7.24	0.01	0.06	6.99	7.34
pH eutocia	20	7.21	7.19-7.23	0.01	0.05	7.1	7.32
pH distocia	30	7.22	7.20-7.25	0.01	0.07	6.99	7.34

Quadro 2. Número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para células azuis e células alaranjadas obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio da coloração com Azul de Nilo.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
Células Azuis	50	21	16-27	2,7	19	5	103
Células Alaranjadas	50	1,7	1,4-2,1	0,18	1,2	1	5

Quadro 3. Número de amostras (N), médias, intervalos de confiança (IC 95%), erros padrão (EP), desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para células azuis e células alaranjadas obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio da coloração Hematoxilina-Shorr.

Variável	N	Média	IC 95%	EP	DP	Mín.	Máx.
Células Azuis	50	19	18-21	0,8	5,7	4	28
Células Alaranjadas	50	81	79-82	0,8	5,7	28	96

Quadro 4. Número de amostras (N), médias, desvios padrão (DP), valores mínimos (Mín) e valores máximos (Máx) para proporções entre células alaranjadas e azuis (L:A) obtidas por meio da citologia do líquido amniótico de bezerros da Raça Holandesa Preta e Branca maduros, a termo e hígidos no momento do parto, por meio das colorações com Azul de Nilo e Hematoxilina-Shorr.

Variável	N	Média	DP	Mín.	Máx.
Proporção L: A (Azul de Nilo)	50	8%	2%	4%	16%
Proporção L: A (Hematoxilina-Shorr)	50	80%	5%	72%	96%

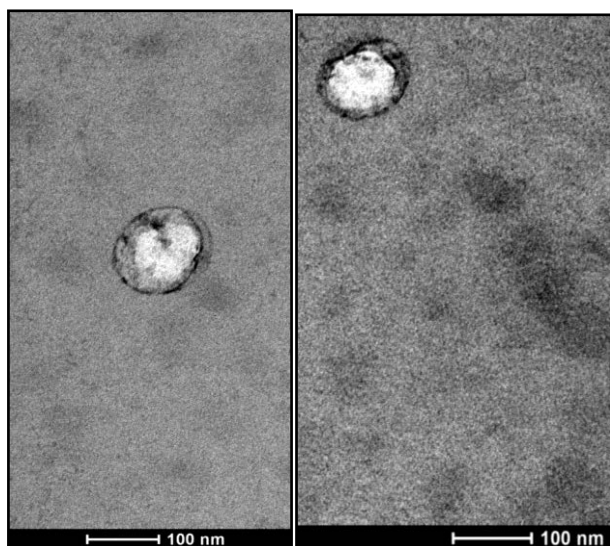


Figura 1

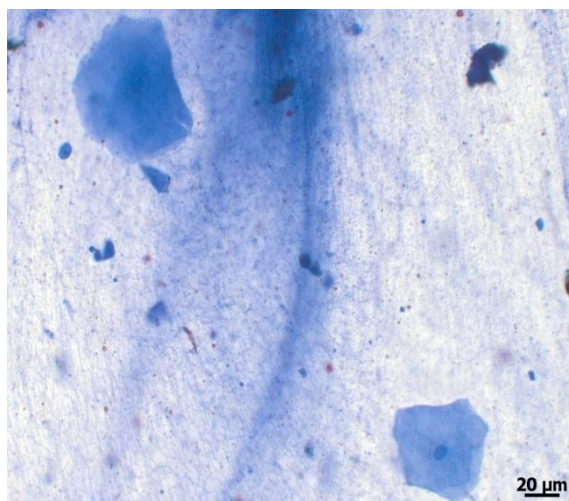


Figura 2

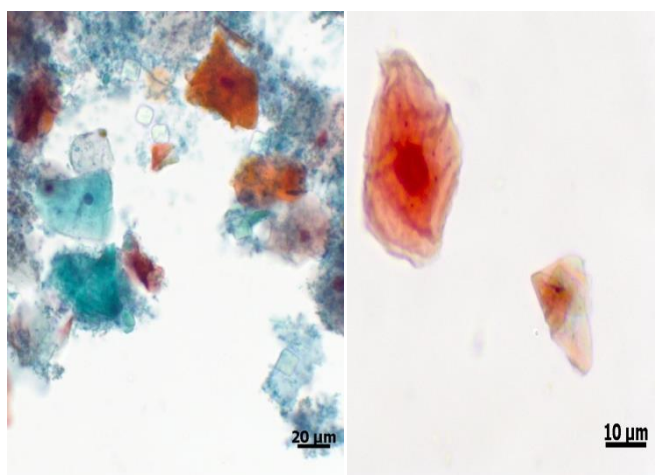


Figura 3

ANEXOS

Anexo I. Modelo do “Termo de Consentimento” assinado pelo proprietário dos animais utilizados no experimento.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”	 fmvz - unesp Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu
---	---	---

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a coleta de líquido amniótico de 50 vacas no momento do parto com realização posterior de exame físico e colheita de sangue dos seus respectivos bezerros, referente ao Projeto de Mestrado da aluna Gabriela Nascimento Dantas intitulado ***“MATURIDADE PULMONAR E FETAL DE BEZERROS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA RECÉM-NASCIDOS, A TERMO E HÍGIDOS: ANÁLISE DO LÍQUIDO AMNIÓTICO”*** sob orientação do Professor Roberto Calderon Gonçalves do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu.

Nome da propriedade: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____

Data: ____/____/____

Assinatura: _____

Anexo II. Valores individuais (n=50) das variáveis estudadas no presente trabalho.

Bezerro	Vaca	Parto	Coloração LA	Aspecto LA	Viscosidade LA	Grumos LA	Clements Original
1	4568	tração	clara	turvo	+++	presente	negativo
2	5494	tração	clara	turvo	+	ausente	negativo
3	5384	tração	clara	turvo	+++	ausente	negativo
4	4415	tração	clara	turvo	+++	presente	negativo
5	5477	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
6	3043	eutocia	clara	turvo	+	ausente	negativo
7	3361	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
8	5267	eutocia	clara	turvo	++	presente	negativo
9	4804	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
10	3846	eutocia	clara	turvo	++	presente	negativo
11	1672	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
12	4554	eutocia	amarelada	turvo	+	ausente	negativo
13	3972	eutocia	clara	turvo	+++	presente	negativo
14	3582	eutocia	clara	turvo	++	presente	negativo
15	5547	tração	clara	turvo	+++	ausente	negativo
16	2430	tração	clara	turvo	+	presente	negativo
17	3081	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
18	4774	tração	amarelada	turvo	++	ausente	negativo
19	5483	eutocia	clara	turvo	+	ausente	negativo
20	3654	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
21	5535	eutocia	amarelada	turvo	++	presente	negativo
22	3779	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
23	3858	tração	amarelada	turvo	++	presente	negativo
24	4484	tração	clara	turvo	++	presente	negativo
25	2696	eutocia	clara	turvo	++	presente	negativo
26	9732	tração	clara	turvo	+	ausente	negativo
27	1453	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
28	5510	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
29	1	tração	clara	turvo	+	ausente	negativo
30	2	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
31	4482	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
32	5301	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
33	3407	tração	clara	turvo	+++	ausente	negativo
34	2333	tração	amarelada	turvo	+++	ausente	negativo
35	5361	eutocia	clara	turvo	+++	presente	negativo
36	2519	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
37	4411	tração	clara	turvo	+++	ausente	negativo
38	3733	tração	clara	turvo	+++	ausente	negativo
39	1867	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
40	3533	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo

41	3641	tração	clara	turvo	+++	ausente	negativo
42	5508	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
43	4518	tração	avermelhada	turvo	++	ausente	negativo
44	4518	tração	avermelhada	turvo	++	ausente	negativo
45	5303	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
46	3633	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
47	4683	tração	clara	turvo	++	ausente	negativo
48	4639	eutocia	clara	turvo	++	ausente	negativo
49	3	eutocia	clara	turvo	+++	ausente	negativo
50	4	eutocia	clara	turvo	+++	presente	negativo

Bezerro	Clements Barreto	Clements Dantas	Sexo	Mucosa	FC	FR	TR	TPC	AR	CC	pH
1	Negativo	positivo	macho	Rósea	180	44	39,6	2	87	88	7,28
2	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	184	40	39,1	2	79	90	7,19
3	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	144	32	38,8	2	78	85	7,21
4	Negativo	positivo	macho	Rósea	168	36	37,7	2	77	83	7,34
5	Negativo	positivo	macho	Rósea	164	32	38,7	2	79	100	7,21
6	Negativo	positivo	macho	Rósea	136	40	38,6	2	78	93	7,24
7	Negativo	positivo	macho	Rósea	124	48	38,7	2	78	87	7,21
8	Negativo	positivo	macho	Rósea	135	40	38,6	2	79	86	7,30
9	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	140	45	39,9	2	80	91	7,25
10	Negativo	positivo	macho	Rósea	135	40	39,6	2	79	90	7,20
11	Negativo	positivo	macho	Rósea	140	45	39,1	1	80	91	7,24
12	Negativo	positivo	macho	Rósea	135	40	38,8	2	90	99	7,20
13	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	140	45	39,3	1	82	96	7,16
14	Negativo	positivo	macho	Rósea	120	60	39,2	2	78	96	7,23
15	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	150	34	39,3	2	84	93	7,11
16	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	103	43	39,2	2	83	79	7,27
17	Negativo	positivo	macho	Avermelhada	92	46	39	1	83	94	7,30
18	Negativo	positivo	macho	Rósea	140	45	39	1	78	90	7,27
19	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	140	48	38,8	2	72	83	7,18
20	Negativo	positivo	macho	Rósea	140	64	38,9	2	78	89	7,19
21	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	88	48	39,2	1	71	82	7,20
22	Negativo	positivo	macho	Rósea	168	32	38,6	2	70	90	7,32
23	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	152	60	38,2	2	77	79	7,19
24	Negativo	positivo	macho	Rósea	76	40	39,3	2	76	94	7,23

25	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	200	36	39,2	2	75	91	7,24
26	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	135	40	39	1	78	90	7,18
27	Negativo	positivo	macho	Rósea	140	45	39	1	79	90	7,24
28	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	135	40	39	1	78	90	7,20
29	Negativo	positivo	macho	Rósea	140	45	39	1	79	90	7,28
30	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	135	40	39	1	78	90	7,20
31	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	140	45	39	1	79	90	7,32
32	Negativo	positivo	macho	Rósea	136	40	39,1	2	78	86	7,23
33	Negativo	positivo	macho	Azulada	100	48	39,4	2	86	91	7,21
34	Negativo	positivo	macho	Rósea	180	48	39,2	2	81	76	7,27
35	Negativo	positivo	macho	Rósea	128	60	39,4	2	82	96	7,10
36	Negativo	positivo	macho	Rósea	172	52	38,3	2	82	96	7,09
37	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	120	44	40,2	2	71	88	6,99
38	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	120	40	40	2	71	97	7,24
39	Negativo	positivo	macho	Azulada	100	60	40	2	69	91	7,22
40	Negativo	positivo	macho	Rósea	116	40	40,2	2	80	93	7,20
41	Negativo	positivo	macho	Rósea	140	60	39,5	2	95	82	7,23
42	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	180	36	39,8	2	70	87	7,20
43	Negativo	positivo	macho	Rósea	172	32	38,3	2	77	84	7,27
44	Negativo	positivo	macho	Rósea	160	24	35,3	2	74	94	7,32
45	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	112	28	38,6	2	80	98	7,22
46	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	136	24	39,3	2	82	91	7,24
47	Negativo	positivo	macho	Rósea	100	44	39,4	2	79	104	7,23
48	Negativo	positivo	macho	Rósea	116	44	40,1	2	80	87	7,15
49	Negativo	positivo	macho	Rósea	135	45	39	1	78	90	7,20
50	Negativo	positivo	fêmea	Rósea	140	40	39	1	79	90	7,23

Bezerro	Apgar - I	Apgar - II	Apgar - III	Apgar - IV	Azuis Nilo	Azuis HS	Laranjas Nilo	Laranjas HS
1	2	1	2	2	45	20	4	80
2	2	1	2	2	11	21	1	79
3	2	2	2	2	14	4	1	96
4	2	2	2	2	12	23	1	77
5	2	1	2	2	21	22	2	78
6	2	2	2	2	7	25	1	75
7	2	2	2	2	35	28	3	72

8	2	1	2	2	12	17	1	83
9	2	2	2	2	24	17	2	83
10	2	2	2	2	16	18	1	82
11	2	2	2	2	16	20	1	80
12	2	2	2	2	13	24	1	76
13	2	2	2	2	27	13	2	87
14	2	2	2	2	15	13	1	87
15	2	2	2	2	31	20	3	80
16	1	2	2	2	33	21	3	79
17	1	2	2	2	11	4	1	96
18	2	2	2	2	7	23	1	77
19	2	2	2	2	7	22	1	78
20	2	2	1	2	9	25	1	75
21	2	2	2	2	41	28	4	72
22	2	2	2	2	22	17	2	83
23	1	2	2	2	15	17	1	83
24	2	2	1	2	23	18	2	82
25	2	2	2	2	6	20	1	80
26	2	2	2	2	17	24	1	76
27	2	2	2	2	9	13	1	87
28	2	2	2	2	11	13	1	87
29	2	2	2	2	13	20	1	80
30	2	2	2	2	10	21	1	79
31	2	2	2	2	27	4	2	96
32	2	2	1	2	81	23	5	77
33	2	2	2	1	15	22	1	78
34	2	2	2	2	8	25	1	75
35	2	2	2	2	45	28	4	72
36	2	2	2	2	14	17	1	83
37	2	2	1	2	19	17	1	83
38	2	2	2	2	23	18	2	82
39	2	2	2	1	14	20	1	80
40	2	2	2	2	6	24	1	76
41	2	2	2	2	5	13	1	87
42	2	2	2	2	49	13	4	87
43	2	2	2	2	10	20	1	80
44	2	2	2	2	10	21	1	79
45	2	2	1	2	7	23	1	77
46	2	2	2	2	10	22	1	78
47	2	2	1	2	56	25	5	75
48	2	2	2	2	16	28	1	72
49	2	2	2	2	103	17	5	83
50	2	2	2	2	8	17	1	83