

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

SAMIR KHAL DE SOUZA

**ESTUDO COMPARATIVO DOS NÍVEIS DE LACTATO MATERNO,
PLACENTÁRIO E FETAL EM RATOS NO PARTO NORMAL E CESÁREO
COM E SEM ASFIXIA INTRAUTERINA**

Porto Alegre

2011

SAMIR KHAL DE SOUZA

**ESTUDO COMPARATIVO DOS NÍVEIS DE LACTATO MATERNO,
PLACENTÁRIO E FETAL EM RATOS NO PARTO NORMAL E CESÁREO
COM E SEM ASFIXIA INTRAUTERINA**

Projeto de trabalho de conclusão de curso realizado como requisito parcial da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso I – ENF99004, do curso de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Emílio Frizzo

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Luiza Maria Gerhardt

Porto Alegre

2011

Dedico essa conquista a meus pais João Luiz e Rosalinda Khal, a meus irmãos João Luiz Filho e Amanda, bem como aos meus professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, Prof. Marcos Emilio dos Santos Frizzo, pela dedicação, acolhimento, profissionalismo e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, Prof. Luiza Maria Gerhardt pelos ensinamentos, sugestões desde a elaboração do projeto até a versão final e por me auxiliar em momentos de grandes dificuldades.

A todos os meus amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada pela ajuda e atenção que me foi prestada em algumas etapas desse projeto e em outros projetos: Prof. Anapaula Vinagre, Tiago Leal, Ricardo Pelegrino, Charles Pinto, Camila Rossetti e Aline Gonçalves.

A todos os professores e colegas que estiveram envolvidos na minha formação ao longo do Curso.

RESUMO

O metabolismo anaeróbico da glicose é utilizado para manter a homeostasia do trifosfato de adenosina, em tecidos e em situações distintas. O lactato gerado em tais condições é utilizado como substrato para a gliconeogênese ou é oxidado e convertido à ATP. Esse estudo verificou a lactacidemia materna, fetal e placentária em ratos, logo após parto normal ou cesáreo, comparando os níveis de lactato de animais obtidos em condições de normoxia e de asfixia intrauterina. Procuramos identificar a origem do lactato fetal, compreender sua importância para o neonato, e comparar os benefícios do parto normal em relação ao cesáreo. Ratas Wistar no 22º dia de gestação submetidas à cesariana. Um corno uterino foi isolado e mantido em solução salina 0,9% a 37°C por 15 min (asfixiado) (n=9) enquanto era realizada a histerectomia do outro corno, obtendo-se neonatos controle (n=8). Alguns controles foram estimulados a respirarem e mantidos a 34°C por 60 min (n=7). Ao término da asfixia, alguns neonatos foram decapitados imediatamente, enquanto outros, estimulados a respirarem e mantidos a 34°C por 60 min (n=7). Na coleta do sangue, foram utilizados tubos tratados com fluoreto de sódio (100mM) e centrifugados (2500G, 10min). Para determinar os níveis plasmáticos de lactato utilizou-se o método enzimático colorimétrico com Kit Katal e os resultados expressos em mmol/L. Os resultados indicam que a asfixia intra-uterina (15 min) aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de lactato. Os animais submetidos à asfixia intra-uterina demonstraram lactacidemia maior após recuperação (normóxia) de 60 min. Os níveis de lactato dos animais nascidos de parto normal não apresentaram diferença significativa em relação aos neonatos controle de parto cesáreo. Porém, apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de lactato após 60 min de recuperação (normoxia). Os níveis de lactato materno após PN foram ($p < 0,05$) menores que os obtidos após PC. Asfixia intra-uterina aumentou ($p < 0,05$) os níveis de lactato nas placentas em relação ao grupo controle e PN. Não houve diferença entre os níveis de lactato obtidos de placentas após parto normal ou grupo cesáreo controle. Conclui-se que os asfixiados não foram capazes de reverterem à acidose metabólica, sugerindo que não utilizaram o lactato como substrato energético. Neonatos de parto normal apresentaram habilidade em reduzir os níveis de lactato plasmático, fato que os diferenciou dos neonatos controle de parto cesáreo. Os resultados sugerem que existe uma transferência placentária de lactato para os fetos.

Palavras-chave: Lactato, Asfixia perinatal, Parto normal, Parto cesáreo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação das alterações fisiológicas em um processo hipóxico	13
Figura 2	Fotografia de animais obtidos de parto cesáreo	21
Figura 3	Lactacidemia obtida imediatamente após a histerectomia	22
Figura 4	Lactacidemia obtida 60 min após a histerectomia.	22
Figura 5	Lactacidemia obtida após parto normal	23
Figura 6	Lactacidemia materna determinada na cesariana (PC) ou após parto normal (PN)	24
Figura 7	Lactacidemia materna e de neonatos, após parto cesáreo ou normal	24
Figura 8	Lactato obtido de placentas após cesariana ou parto normal	25

LISTA DE PALAVRAS

ATP: trifosfato de adenosina

g: medida de força centrífuga

mM: milimolar

mmol/L: milimol por litro

min: minuto

NaF: fluoreto de sódio

NMDA: receptores *N*-metil-D- aspartato

PC: parto cesáreo

PN: parto normal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Lactato e a unidade fetoplacentária	11
3.2 Asfixia perinatal e seus aspectos fisiopatológicos	12
4 METODOLOGIA	16
4.1 Tipo de estudo	16
4.2 Campo ou contexto	16
4.3 População e amostra	16
4.4 Materiais e métodos	17
4.4.1 Obtenção de neonatos por parto normal	17
4.4.2 Obtenção de neonatos por parto cesáreo	18
4.4.3 Dosagem do lactato plasmático	18
4.4.4 Dosagem do lactato placentário	19
4.4.5 Grupos amostrais	19
4.5 Coleta de dados	20
4.6 Análise estatística	20
4.7 Aspectos éticos	20
5 RESULTADOS	21
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXO A – Carta de Aprovação CEP – UFRGS	38

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo anaeróbico da glicose é utilizado como alternativa para manter a homeostasia do ATP, seja em tecidos que necessitam de grandes demandas energéticas, que não realizam a oxidação da glicose ou por apresentarem pouca vascularização. O lactato gerado em tais condições é utilizado como substrato para a gliconeogênese ou é oxidado e convertido à fonte energética, principalmente no fígado. Entretanto, estudos experimentais em gestantes humanas, *in vivo* e *in vitro*, têm demonstrado que o mesmo é produzido na placenta e distribuído tanto na circulação materna quanto na fetal, que constitui uma fonte de carbono para o crescimento fetal. O fígado fetal é o órgão com o mais alto consumo de lactato e a captação hepática é quase igual à captação umbilical. Neste caso, o lactato é utilizado para oxidação e síntese de ácidos graxos e glicogênio. Uma vez que o acúmulo de ácido láctico pode causar acidose no feto, este sistema ainda poderia prevenir o acúmulo de lactato fetal, ficando claro que sob condições normais, a captação hepática fetal é a principal via para sua remoção.

Na gestação humana, a concentração de lactato fetal é mais alta que a materna. Resultados de estudos clínicos realizados no momento da expulsão espontânea demonstram que essas concentrações podem vir a ser um marcador mais confiável de acidose fetal que medidas de pH. De fato, muitos estudos têm analisado as concentrações de lactato fetal em diferentes situações clínicas e têm demonstrado que as mesmas apresentam uma boa correlação com o prognóstico neonatal.

Segundo a literatura científica, fetos e neonatos apresentam maior tolerância à hipóxia quando comparados com animais adultos. Muitos mecanismos contribuem para esta tolerância, incluindo um direcionamento do fluxo sanguíneo para órgãos críticos, tais como o cérebro, e uma redução regulada da taxa metabólica antes que as reservas de oxigênio sejam completamente extintas. Entretanto, durante hipóxia profunda, como aquela induzida pela oclusão do cordão umbilical, a pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo cerebral diminuem e o uso do oxigênio atinge níveis insignificantes. Com tal estresse severo qualquer produção de energia residual do cérebro deve depender de vias anaeróbicas, normalmente um tanto limitadas no adulto, mas possivelmente de mais importância no feto, considerando sua aumentada tolerância ao estresse anóxico.

Vários estudos demonstram que a asfixia perinatal é um dos principais determinantes de morbidade e comprometimento neurológicos na população pediátrica. Experimentalmente, esta condição pode ser induzida pelo uso de um modelo não invasivo de asfixia perinatal graduada. Neste modelo, o corno uterino ainda contendo os fetos é isolado e mantido com temperatura que mimetiza a corporal, por períodos determinados de tempo. Esta condição reproduz todas as características (acidose, hipercapnia e hipóxia) observadas durante a situação clínica da asfixia perinatal.

Se por um lado níveis elevados de lactato são considerados na clínica como um importante indicador de sofrimento neonatal, por outro, parecem constituir um valioso substrato energético para o feto/neonato. Desta forma, é de grande relevância estudar a presença do mesmo tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas.

O meu interesse em pesquisar a asfixia perinatal está relacionado com a complexidade das alterações que surgem no feto ou neonato quando a lesão asfíxica se instala no organismo destes. Muitos dos acontecimentos decorrentes da asfixia não estão totalmente esclarecidos e isto pode prejudicar a conduta que os membros da equipe de saúde adotam ao atender o neonato que sofreu esse tipo de dano. Esses fatores reforçam a importância da pesquisa de base como um instrumento capaz de subsidiar conhecimentos aos profissionais da saúde bem como em outras áreas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Determinar a lactacidemia materna, fetal e placentária em ratos, logo após parto normal ou cesáreo, comparando os níveis de lactato de animais obtidos em condições de normoxia e de asfixia intrauterina.

2.2 Objetivos específicos

a) A partir da determinação dos níveis de lactato nas diferentes condições e tecidos, esperamos identificar sua origem e contribuir com informações que auxiliem no entendimento da importância do mesmo para o neonato, tendo em vista que este é descrito como indicador de sofrimento neonatal, mas ao mesmo tempo é considerado um importante substrato energético.

b) Estabelecer uma comparação entre os benefícios do parto normal em relação ao parto cesáreo, utilizando parâmetros bioquímicos e fisiológicos identificados nas fêmeas prenhas e seus neonatos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lactato e a unidade fetoplacentária

O lactato representa o produto final do metabolismo anaeróbico da glicose e quantitativamente é o mais importante monocarboxilato. O mesmo pode servir como um substrato energético para o músculo esquelético, porém dados têm mostrado que os neurônios também podem utilizar o lactato para produzir energia. Estudos experimentais em gestantes humanas, *in vivo* (BURD et al., 1975; MARCONI et al., 1990; SINGER, 1999) e *in vitro* (CARSTENSEN et al., 1983; HOLZMAN et al., 1979) têm demonstrado que o mesmo é produzido na placenta, e distribuído tanto na circulação materna quanto na fetal, que constitui uma fonte de carbono para o crescimento fetal (SPARKS et al., 1982).

Embora sejam encontradas diferenças anatômicas, histológicas, metabólicas e de permeabilidade na constituição placentária de diferentes espécies, um de seus objetivos principais, a manutenção da transferência placentária, contribui para a existência de processos comuns entre os vivíparos (PRIETO, 1988). É descrito que a taxa respiratória fetal impõe uma necessidade de outras fontes de carbono além da glicose e, com a finalidade de atender parte dessa necessidade, a placenta converte a glicose a lactato na maioria das espécies. Assim, a placenta atua não somente transportando nutrientes, mas fornecendo produtos metabólicos para o metabolismo fetal (HAY, 1995).

Estudos *in vitro* indicam que o cérebro fetal de ratos utiliza o lactato como fonte para síntese de lipídeos ou para oxidá-lo a dióxido de carbono (PRIETO, 1988). O fígado fetal é o órgão com o mais alto consumo de lactato e a captação hepática é quase igual à captação umbilical. Neste caso, o lactato é utilizado para oxidação, síntese de ácidos graxos e glicogênio (GLEASON et al., 1985). Uma vez que o acúmulo de ácido láctico pode causar acidose no feto, este sistema ainda poderia prevenir o acúmulo de lactato fetal, ficando claro que, sob condições normais, a captação hepática fetal é a principal via para sua remoção.

Estudos demonstraram que, na gestação humana, a concentração de lactato fetal é mais elevada que a materna (MARCONI et al., 1990 e STEMBERA et al., 1966), e resultados de estudos clínicos realizados no momento da expulsão espontânea demonstram que estas concentrações podem vir a ser um marcador mais confiável de acidose fetal que medidas de

pH (BORRUTO et al., 2006; KRUGER et al., 1999; NORDSTROM et al., 1996; SUIDAN et al., 1984; SUIDAN e YOUNG, 1984).

3.2 Asfixia perinatal e seus aspectos fisiopatológicos

A asfixia perinatal pode ser definida como um evento prejudicial ao feto ou neonato devido à ausência ou diminuição das trocas gasosas, ocasionando o surgimento de hipóxia e/ou isquemia (Fig. 1). Esta situação promove o surgimento de acidose metabólica, que é considerado um importante indicador clínico de asfixia perinatal. É possível que a asfixia possa ocorrer antes do parto, durante o parto ou imediatamente após o nascimento. Existem quatro mecanismos básicos que podem ocasionar asfixia perinatal: interrupção do fluxo sanguíneo no cordão umbilical, alterações nas trocas de oxigênio através da placenta, inadequada perfusão placentária e falha na expansão ou na circulação pulmonar ao nascer (ALONSO-SPILSBURY et al., 2005). A asfixia perinatal tem um forte impacto em estruturas do sistema nervoso central afetando regiões como o tálamo, gânglio basal, hipocampo e tronco cerebral. Ao nível celular surge uma série de alterações bioquímicas (na síntese de fosfatos de alta energia, ativação de rotas metabólicas alternativas), objetivando a manutenção celular durante o estresse da asfíxia. Porém, esgotadas as formas de manter a homeostasia tecidual, tem início uma cascata de eventos (acúmulo na fenda sináptica de neurotransmissores, aumento intracelular de íons de cálcio, ativação de proteases e dos receptores NMDA, formação de espécies reativas de oxigênio) que resultam em sérios danos ou em morte celular (Villapol et al., 2008).

A identificação da asfixia pode ser realizada através de diferentes indicadores clínicos, como determinação do pH, da concentração de dióxido de carbono e de oxigênio sanguíneos, teste funcional neurológico ou cardiopulmonar, escores de Apgar. Assim sendo, é possível estabelecer um prognóstico sobre a extensão das sequelas no organismo e avaliar qual a intervenção mais adequada. No ambiente clínico, a principal intervenção é baseada na terapia de suporte como forma de estabilizar os parâmetros fisiológicos sistêmicos, porém essa prática não impede o agravo da lesão após o restabelecimento da oxigenação (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2010).

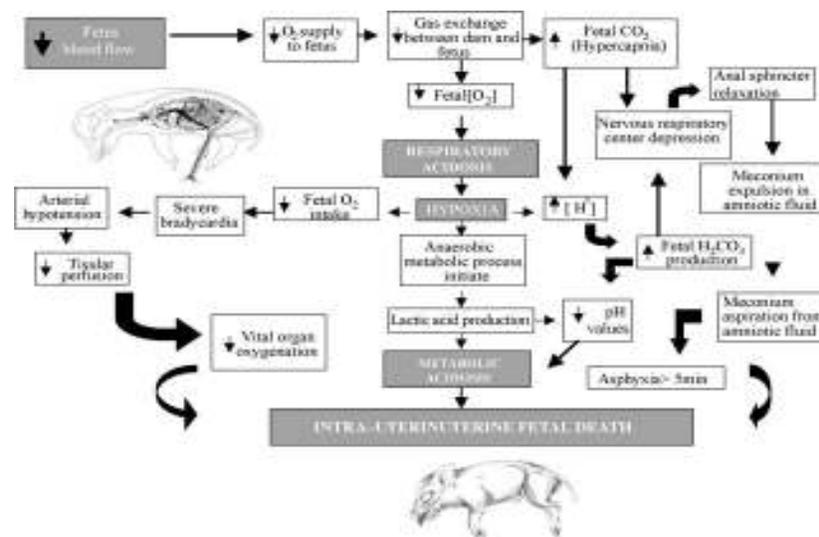


Figura 1 – Representação das alterações fisiológicas em um processo hipóxico.

Fonte: (ALONSO-SPILSBURY et al., 2005).

Segundo a literatura científica, fetos e neonatos de ratos apresentam maior tolerância à hipóxia quando comparados com animais adultos, segundo Duffy et al., (1975) e Gunn et al., (2001). Muitos mecanismos contribuem para esta tolerância, incluindo um direcionamento do fluxo sanguíneo para órgãos críticos tais como o cérebro, e uma redução regulada da taxa metabólica antes que as reservas de oxigênio sejam completamente extintas (BENNET et al., 1998; JENSEN et al., 1999; SINGER, 1999). Em conjunto, estas mudanças tendem a manter a relação suprimento de oxigênio/uso de oxigênio durante o estresse hipóxico.

Na ovelha fetal, o fluxo sanguíneo cerebral aumenta na hipóxia moderada tanto quanto aumenta o aporte de oxigênio para o cérebro à custa de tecidos periféricos (BISHAI et al., 2003; JONES et al., 1978). Entretanto, durante hipóxia profunda, como aquela induzida pela oclusão do cordão umbilical, a pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo cerebral diminuem e o uso do oxigênio atinge níveis insignificantes (HUNTER et al., 2003). Com tal estresse severo, qualquer produção de energia residual do cérebro deve depender de vias anaeróbicas, normalmente um tanto limitadas no adulto (CHIH et al., 2001), mas possivelmente de mais importância no feto, de acordo com sua aumentada tolerância ao estresse anóxico (HOHIMER et al., 1991; VAN CAPPELLEN et al., 1999).

Durante hipóxia moderada, o fluxo sanguíneo cortical aumenta e o metabolismo do oxigênio é significativamente reduzido, mas o metabolismo anaeróbico não parece ser a

principal fonte de produção de energia (HUNTER et al., 2003). Entretanto, durante asfixia severa (10 minutos de oclusão do cordão umbilical), evidenciada por marcante acidose, hipercapnia, hipotensão, hipoperfusão cerebral e pronunciada hipóxia tecidual, a glicólise anaeróbica parece ser a responsável pela manutenção das funções metabólicas essenciais no cérebro fetal.

Evidências sugerem que o suprimento de oxigênio e a taxa metabólica possam ser regulados de forma associada antes que asfixia severa provoque extinção de oxigênio. Uma vez que estas respostas ocorrem antes que as reservas de ATP sejam esgotadas, o mecanismo tem sido denominado hipometabolismo adaptativo ou regulado (ROHLICEK et al., 1998; SUZUKI et al., 2000). Assim, enquanto a hipóxia progressivamente torna-se mais profunda no feto e recém nascido de muitas espécies, o consumo de oxigênio cerebral também diminui progressivamente (BOUTILIER, 2001; HOCHACHKA e LUTZ, 2001; VANNUCCI e DUFFY, 1976).

A capacidade para reduzir o uso não essencial de oxigênio durante a hipóxia moderada, e de aumentar contribuições anaeróbicas para produção de ATP durante asfixia severa, pode constituir o principal mecanismo responsável pela pronunciada tolerância fetal à hipóxia. O trabalho de Hermansen (2003) provê evidências experimentais que sustentam o relativo efeito protetor de uma fraca ou moderada acidemia láctica para o cérebro. Neste caso, bebês asfixiados e com acidemia poderiam se beneficiar da vasodilatação cerebral causada por esta condição, utilizando adicionalmente o lactato como nutriente.

A incidência de asfixia perinatal é reportada em 2-6/1000 nascidos a termo, em países desenvolvidos (LAWN et al., 2005). BASU et al., (2009) relata que a asfixia perinatal não é apenas a causa mais comum de mortalidade (28,8%) e morbidade, mas também é o principal fator relacionado ao elevado número de natimortos (45,1%) na Índia. Valores igualmente elevados são estimados em outros países em desenvolvimento (LAWN et al., 2005). Estudos realizados por Weitzdoerfer et al. (2004) demonstram que a asfixia perinatal é um dos principais determinantes de morbidades e comprometimento neurológicos na população pediátrica. O impacto dos danos está relacionado com a extensão do insulto, sendo a asfixia severa associada à paralisia cerebral, ao retardo mental e à epilepsia. Processos de asfixia considerados de menor severidade são relacionados ao déficit de atenção e hiperatividade em crianças e adolescentes (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2010).

Experimentalmente, esta condição pode ser induzida pelo uso de um modelo não invasivo de asfixia perinatal graduada, em roedores, descrito por Herrera-Marschitz et al. (1993) e por Bjelke et al. (1991). Neste paradigma, o corno uterino ainda contendo os fetos é isolado e mantido com temperatura que mimetiza a corporal, por períodos determinados de tempo. Esta condição reproduz todas as características (acidose, hipercapnia e hipóxia) observadas durante a situação clínica da asfixia perinatal.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, do tipo pesquisa experimental, desenvolvido em ambiente laboratorial. Neste estudo, foi realizada a manipulação dos animais utilizados, incluído o uso de grupo controle e o experimental, assim como a randomização dos mesmos. Os experimentos são as melhores ferramentas para testar as hipóteses de causa e efeito. Devido às suas propriedades especiais de controle, um experimento oferece maior corroboração do que qualquer outra abordagem de pesquisa de que a variável independente afete a variável dependente (POLIT et al., 2004).

4.2 Campo ou contexto

O estudo foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Departamento de Ciências Morfológicas, em associação com o Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, ambos do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.3 População e amostra

A partir de conhecimento adquirido com projetos anteriores (aprovados no CEP/UFRGS, nº 2006581 e nº 2008000), para ciclagem e obtenção das ratas grávidas, foram utilizadas 17 fêmeas e 2 machos adultos para realização dos acasalamentos. De acordo com nossa experiência, cada rata apresenta em média 8 fetos. Entretanto, o mais frequente é que a distribuição destes nos cornos uterinos não seja pareada. Desta forma, não podemos definir exatamente o número de ratas grávidas que serão necessárias para obtenção de neonatos por parto normal. Entretanto, foi estimado que com 3 a 5 partos, obteremos o número de amostra necessário para cada grupo, 3 experimentos independentes com cada condição em triplicata (n=3). Este n foi determinado a partir de um trabalho prévio (FRIZZO et al., 2010).

4.4 Materiais e métodos

Foram utilizados ratos Wistar procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após uma semana de ambientação, as ratas eram submetidas a exames colpocitológicos para detectar a fase do ciclo estral, sempre no mesmo horário. As fêmeas eram alocadas em caixas individuais com machos, após identificada a fase receptível ao macho, assim permanecendo até o dia seguinte quando era realizado um novo exame colpocitológico confirmando ou não o acasalamento. Todos os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (20 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*, conforme a Lei nº 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica.

4.4.1 Obtenção de neonatos por parto normal:

No 22º dia de gestação, a fêmea grávida era transferida para o laboratório e observada até o início do nascimento dos filhotes. Após cada expulsão, o neonato e a respectiva placenta eram imediatamente retirados da caixa. A placenta foi colocada num minitubo previamente identificado e mergulhado em nitrogênio líquido. O neonato foi pesado, decapitado e o sangue coletado em um mini-tubo pré-tratado com fluoreto de sódio (0,1 M) e, logo após, mergulhado em gelo até que todas as amostras do experimento fossem obtidas. O sexo dos animais foi registrado para posterior análise de correlação. Alguns neonatos foram estimulados a respirar e mantidos a 34°C por 60 min. No final deste período de recuperação, foram decapitados e o sangue coletado para dosagem de lactato. Ao término do parto, foi realizado desnucamento cervical e o sangue materno coletado por punção intra-cardíaca, sendo transferido para um minitubo tratado com fluoreto de sódio (0,1 M). As amostras de sangue foram utilizadas para determinação dos níveis de lactato.

4.4.2 Obtenção de neonatos por parto cesáreo:

O procedimento cirúrgico do parto cesáreo foi realizado em ratas no 22º dia de gestação para a obtenção de animais controles e asfixiados intra-uterinamente. Após desnucamento cervical, foi realizada a cesariana e um dos cornos uterinos teve as extremidades clipadas com pinças hemostáticas, sendo removido e transferido para uma solução salina à temperatura de 37°C. A manutenção da temperatura da solução salina foi severamente controlada, pois cada grau abaixo de 37°C está diretamente associado a uma maior proteção do feto em relação à lesão gerada pela asfixia (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2010). Durante o período da asfixia, realizou-se a histerectomia do outro corno uterino e os neonatos obtidos (controles) foram decapitados e o sangue e a respectiva placenta coletados para dosagem do lactato. Alguns neonatos controles foram estimulados a respirar e, após, mantidos a 34°C por 60 min. Após o período de asfixia (15 min), os neonatos asfixiados eram retirados do útero, alguns imediatamente decapitados e o sangue e a placenta coletados, enquanto outros foram estimulados a respirar e mantidos a 34°C por 60 min. Ao final do período de 60 min, neonatos controles e asfixiados foram decapitados para dosagem do lactato plasmático. O sangue materno foi obtido por punção intra-cardíaca no momento da incisão cesárea.

4.4.3 Dosagem do lactato plasmático

O nível de lactato plasmático fetal e materno foi analisado imediatamente após o parto normal ou da cesariana. Neste último caso, imediatamente após a histerectomia (controles) ou depois do período de 15 min de asfixia (asfixiados). Nos grupos em que houve período de recuperação, o sangue foi coletado imediatamente ao término dos períodos experimentais e dosado logo após. O sangue coletado foi centrifugado (2500 g, 10 min) e uma alíquota de 10 µL foi retirada do sobrenadante de cada minitubo. Para quantificação do lactato, utilizou-se o método enzimático colorimétrico (Kit KATAL) com leitura em 540 nm.

4.4.4 Dosagem do lactato placentário

Para dosagem do lactato placentário, cada placenta, após ser pesada, era transferida para um tubo pré-tratado com fluoreto de sódio (0,1 M), onde foi acrescentado 1 mL de NaCl. O tecido foi homogeneizado por 1 min, centrifugado (2500 g, 10 min) e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a determinação do lactato total.

4.4.5 Grupos amostrais

Sangue fetal de parto normal imediatamente após o nascimento.

Sangue fetal de parto normal 60 min após o nascimento.

Sangue fetal imediatamente após parto cesáreo.

Sangue fetal de parto cesáreo imediatamente após 15 min de asfixia.

Sangue fetal de parto cesáreo 60 min após cesariana.

Sangue fetal de parto cesáreo, com 15 min de asfixia, coletado após 60 min de recuperação.

Sangue materno após parto normal.

Sangue materno obtido durante parto cesáreo.

Placentas obtidas no parto normal imediatamente após o nascimento.

Placentas obtidas imediatamente após parto cesáreo.

Placentas obtidas por parto cesáreo imediatamente após 15 min de asfixia.

4.5 Coleta dos dados

Os dados referentes ao parto cesáreo foram obtidos previamente, durante procedimentos experimentais do projeto nº 2008000 aprovado pelo CEP-UFRGS, com o objetivo de evitar a perda de material biológico e a necessidade de uso de um número maior de animais. A coleta de dados do parto normal ocorreu nos meses de março e abril de 2011, quando foram realizados os experimentos nos respectivos laboratórios mencionados anteriormente.

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para múltiplas comparações.

4.7 Aspectos éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior no Departamento de Ciências Morfológicas. O projeto de número 18335, com título: **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal no parto natural ou cesáreo com e sem asfixia intra-uterina** foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo A).

Os procedimentos propostos por esse projeto são de uso habitual por autores que trabalham e obedecem as normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais. Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento, bem como para reduzir o número de animais utilizados nesse estudo.

5 RESULTADOS

No presente trabalho, foram analisados níveis de lactato neonatal de animais obtidos por parto cesáreo ou normal, imediatamente após a histerectomia/nascimento ou após 60 minutos de recuperação em condição de normoxia. Nos animais obtidos por parto cesáreo, comparamos animais submetidos a um episódio de asfixia intra-uterina (asfixiados) com outros obtidos após imediata histerectomia (controles).

Após o procedimento de asfixia intra-uterina (15 min), observamos uma taxa de sobrevivência de 95% e nos neonatos controle, uma taxa de sobrevivência de 100%. Os neonatos asfixiados apresentaram pele cianótica, diminuição dos movimentos e dificuldade respiratória. Aproximadamente 20 minutos após a asfixia, adquiriram coloração rosada e tiveram melhora do padrão ventilatório. Também foi observada uma hipertonia e mudança na postura dos neonatos com aproximadamente 30 minutos após a asfixia (Fig. 2), e término dessas mudanças cerca de 55 minutos após a asfixia. Essa mudança iniciou-se com uma perda da curvatura anatômica da região lombar, seguida por extensão dos membros inferiores e resistência ao movimento.



Figura 2: Representação das alterações identificadas em animais asfixiados transcorridos 30 minutos de recuperação. Os animais do grupo asfixiado exibiam melhora da cianose, porém apresentavam mudanças no tônus muscular principalmente na região dorsal e nos membros inferiores.

Fonte: (FRIZZO et al., 2010).

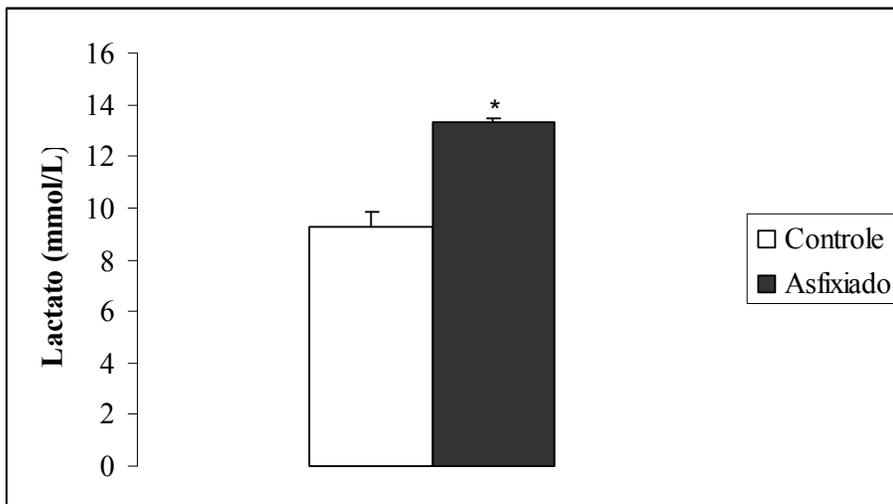


Figura 3: Lactacidemia obtida imediatamente após a histerectomia. A asfixia intra-uterina (15 min) aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de lactato (43%). Grupo controle (n = 9 experimentos) e asfixiado (n = 8 experimentos).

Fonte: SOUZA, S.K. **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfixia intrauterina**, 2011.

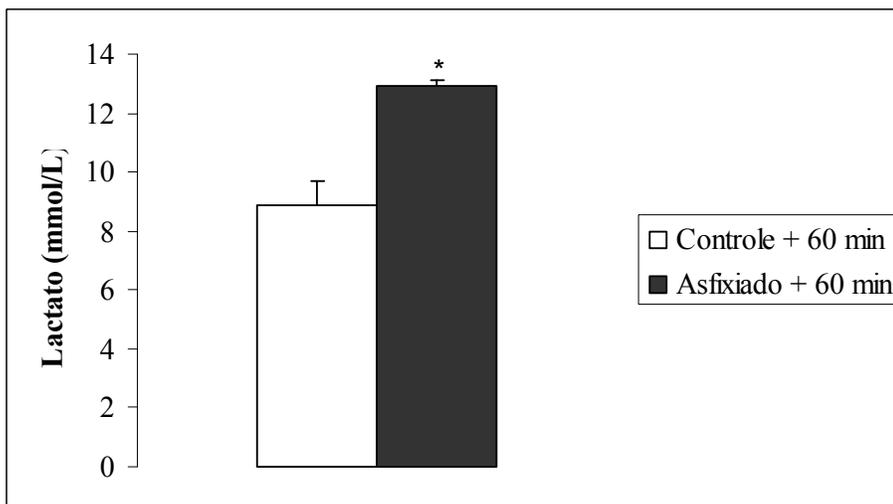


Figura 4: Lactacidemia obtida 60 min após a histerectomia. Animais submetidos à asfixia intra-uterina demonstraram nível de lactato significativamente maior ($p < 0,05$) (46%) após recuperação (normóxia) de 60 min. Grupo controle (n = 7 experimentos) e asfixiado (n = 7 experimentos).

Fonte: SOUZA, S.K. **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfixia intrauterina**, 2011.

Com 22 dias de gestação, as fêmeas foram transferidas para o laboratório, onde foi mantido o ciclo claro escuro e fornecida dieta *ad libitum*. Alguns filhotes nascidos de parto normal foram imediatamente decapitados e outros, mantidos por 60 minutos em incubadora com temperatura controlada. Não foi permitido que os recém nascidos mamassem, pois isso resultaria em mudanças no perfil dos parâmetros bioquímicos e impossibilitaria a realização da comparação entre os diferentes grupos. A maioria dos filhotes nascidos de parto normal apresentou movimentação de todas as estruturas corporais e vocalização, fato que os diferenciou dos neonatos controles nascidos de parto cesáreo.

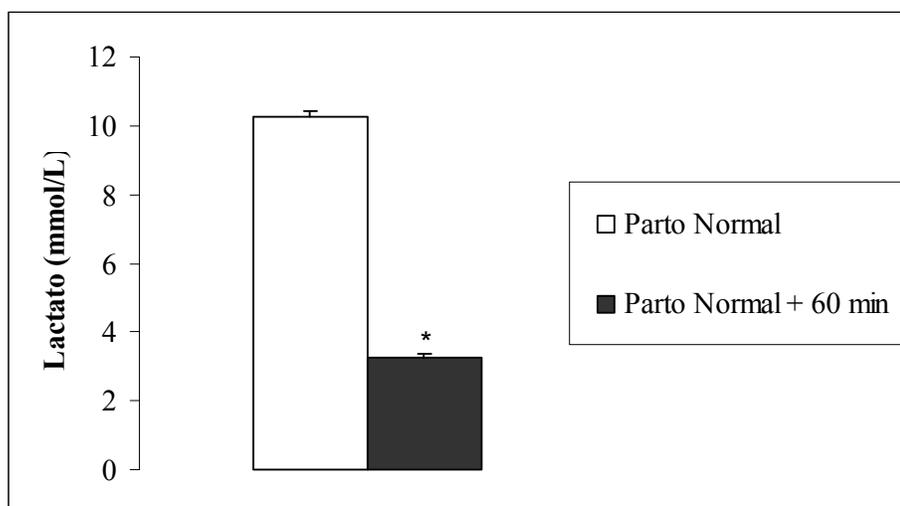


Figura 5: Lactacidemia obtida após parto normal. Animais nascidos de parto normal apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de lactato (60%) após 60 min de recuperação (normoxia), $n = 3$ experimentos.

Fonte: SOUZA, S.K. **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfixia intrauterina**, 2011.

Após o parto normal, as fêmeas foram submetidas ao mesmo processo de eutanásia utilizado nas fêmeas de parto cesáreo. O sangue materno foi coletado imediatamente após o término de cada parto por punção intra-cardíaca.

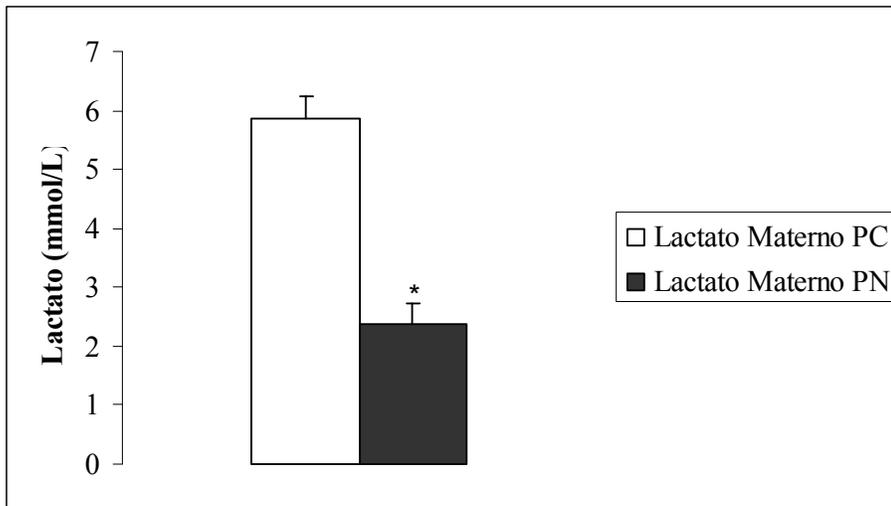


Figura 6: Lactacidemia materna determinada na cesariana (PC) ou após parto normal (PN). Os níveis de lactato materno após PN (n = 3 experimentos) foram significativamente menores ($p < 0,05$) (60%) que os obtidos após PC (n = 10 experimentos).

Fonte: SOUZA, S.K. **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfixia intrauterina**, 2011.

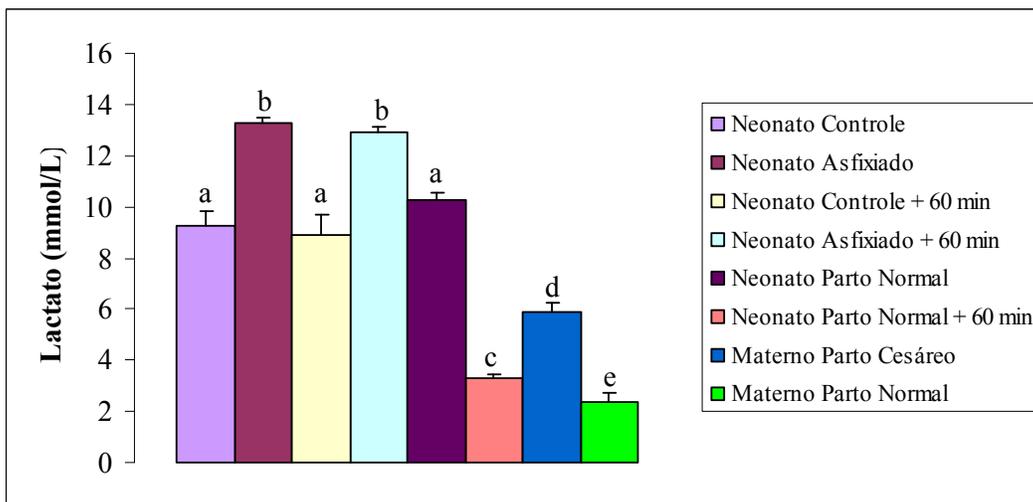


Figura 7: Lactacidemia materna e de neonatos, após parto cesáreo ou normal. Níveis de lactato de neonatos controle obtidos por parto cesáreo foram iguais aos obtidos por parto normal (a) e significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos obtidos por parto normal após 60 min (c). A asfixia intra-uterina aumentou significativamente a lactacidemia em relação aos demais grupos (b) e manteve-se elevada mesmo após 60 min de recuperação. Os níveis de lactato materno foram significativamente diferentes dos obtidos nos demais grupos e quando comparados entre si, lactacidemia materna após parto cesáreo (d) e parto normal (e).

Fonte: SOUZA, S.K. **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfixia intrauterina**, 2011.

Utilizando os conhecimentos adquiridos durante realização dos experimentos de parto normal, vimos que, ao recolhermos todas as placentas, a fêmea desenvolvia um comportamento agitado, o qual gerava um atraso na expulsão dos fetos, resultando em asfíxia intraparto. Naturalmente, após a expulsão, a fêmea consome a placenta e o cordão umbilical do neonato. Visando minimizar o impacto no processo natural de nascimento, apenas algumas placentas de cada experimento foram recolhidas, o que resultou na diminuição da ansiedade materna e no tempo de expulsão dos fetos.

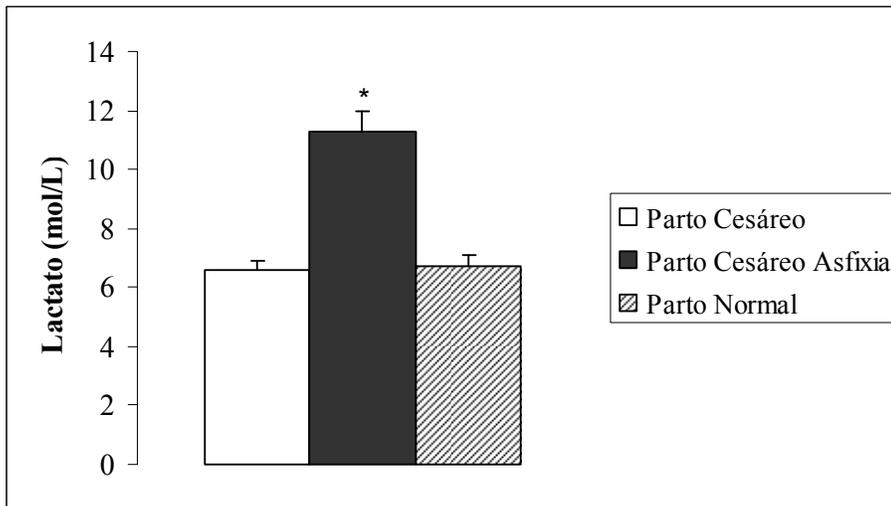


Figura 8: Lactato obtido de placentas após cesariana ou parto normal. Asfíxia intra-uterina (15 min) aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de lactato (71%) nas placentas em relação ao grupo controle ($n = 9$ experimentos). Não houve diferença entre os níveis de lactato obtidos de placentas após parto normal ($n = 3$ experimentos) ou grupo cesáreo controle.

Fonte: SOUZA, S.K. **Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfíxia intrauterina**, 2011.

6 DISCUSSÃO

A asfixia perinatal influencia diretamente a taxa de sobrevivência dos neonatos, bem como desencadeia alguns processos fisiológicos e moleculares que podem ser observados, imediatamente ou decorridos determinados períodos de tempo, após os fetos serem retirados do útero. No trabalho realizado por Lust et al. (2003), é descrito que em regiões do cérebro fetal de ratos como o córtex cerebral, hipocampo e cerebelo são encontrados diversos estoques energéticos (glicogênio, fosfatos de alta energia, glicose e lactato), os quais juntamente com uma baixa taxa metabólica auxiliariam a combater os eventos resultantes de um rápido insulto neurológico. Herrera-Marschitz et al.(2010) relata que, a partir de 15 minutos de asfixia, os níveis de ATP no cérebro diminuem cerca 70% em relação aos controles, junto com uma simultânea queda na taxa de sobrevivência. Em nosso trabalho, as condições dos neonatos obtidos por parto cesáreo estiveram de acordo com o descrito por FRIZZO et al. (2010) em relação a parâmetros de ventilação, cianose da pele e hipertonia lombar. Os animais submetidos a 15 minutos de asfixia intra-uterina apresentaram uma quantidade significativamente maior de lactato plasmático em relação aos respectivos controles, imediatamente após a histerectomia e quando a mesma foi obtida após um período de 60 minutos de recuperação. Concentrações de lactato plasmático menores que 9 mmol/L foram associadas a moderada ou severa encefalopatia hipóxico-isquêmica em neonatos humanos (SILVA et al. (2000). Em outro estudo com neonatos humanos, a asfixia severa foi associada com valores acima de 15 mmol/L, juntamente com um elevado risco de morte e índice de desenvolvimento desfavorável (DESHPANDE e PLATT, 1997).

Estabelecendo uma comparação entre os controles que nasceram por parto cesáreo, em relação aos filhotes nascidos por parto vaginal, não foi identificada diferença na lactacidemia desses grupos. Segundo Vaillancourt et al. (1999), os níveis de lactato no cérebro são geralmente elevados em ratos nascidos por parto vaginal, porém foram encontrados valores adequados de oxigenação sistêmica e níveis preservados de ATP no cérebro desses animais. Entretanto, identificou-se, ao término do período de recuperação, que a lactacidemia dos recém nascidos de parto normal diminuiu significativamente. Este resultado pode sugerir que houve o consumo de uma quantidade significativa do lactato plasmático, fato não identificado no grupo controle nascido de parto cesáreo após a recuperação.

Os níveis de lactato materno, após a histerectomia ou após a expulsão dos fetos, são inferiores quando comparados à concentração encontrada nos fetos dos diferentes grupos experimentais. Essa informação indica que não houve uma transferência materna de lactato para os fetos, uma vez que o lactato possui transferência por difusão facilitada, ou seja, a favor do seu gradiente de concentração (PRIETO, 1988). Comparando níveis de lactato materno obtidos após parto cesáreo ou normal, nossos resultados demonstram níveis significativamente maiores nas fêmeas submetidas à cesariana. Esse achado pode estar relacionado com a liberação do lactato oriundo das placentas para a circulação materna (HAY, 1995), numa condição de ausência de movimentos respiratórios. No parto normal, também não pode ser excluída a utilização do lactato materno com substrato energético pelas fêmeas, durante o trabalho de parto. Considerando o modelo utilizado, não foi encontrado na literatura referências com relação aos níveis de lactato materno após o parto normal.

As placentas foram o grupo amostral que apresentou um maior nível de lactato. Esse achado é condizente com as referências de Prieto (1988), ao relatar que a placenta possui elevada atividade das enzimas piruvato desidrogenase e lactato desidrogenase, bem como diminuída capacidade oxidativa em adequada oxigenação. Hay (1995) descreve a placenta como uma estrutura geradora de lactato e sendo capaz de fornecê-lo como substrato para o desenvolvimento fetal e de também lançá-lo na circulação materna. A concentração de lactato nas placentas dos animais controle apresentou valor semelhante ao encontrado nas placentas dos animais nascidos de parto normal. Nas placentas do grupo asfíxiado, encontramos uma diferença significativamente maior ($p < 0,05$) de lactato em relação às placentas do grupo controle e do grupo parto normal.

Esses valores podem sugerir que o aumento da lactacidemia nos fetos asfíxiados está unicamente relacionado ao aumento do lactato nas placentas. Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, identificamos que após a asfixia os fetos apresentaram uma grande mobilização das reservas de glicogênio, principalmente o hepático, como estratégia para manter elevada a glicemia enquanto havia um predomínio do metabolismo anaeróbico. Tais informações reforçam a hipótese de que o feto asfíxiado é capaz de gerar uma quantidade significativa de lactato a partir de suas reservas glicídicas. Outro elemento importante é o fato de o transporte de lactato ser específico e saturável, (PRIETO, 1988), logo, independentemente da concentração de lactato na placenta, esse será limitado pela ação do transportador.

É comum que os neonatos passem por um episódio de hipoglicemia imediatamente após o nascimento, devido à diminuição no transporte de substratos e oxigênio através do cordão umbilical (PRIETO, 1988). O restabelecimento de um nível adequado de glicose nos recém nascidos é garantido pela glicogenólise e pela gliconeogênese (PRIETO, 1988). Logo, torna-se necessário o consumo do lactato gerado no período de transição da vida fetal para a neonatal, por meio de via oxidativa, como uma forma de assegurar a síntese de energia para os processos celulares e de evitar os efeitos prejudiciais do prolongamento da acidose metabólica (MAYOR, 1988). Alguns estudos demonstram que, ao contrário dos adultos, o lactato rapidamente transpõe a barreira hematoencefálica nos animais imaturos. Magistretti e Pellerin (1999) descrevem que em condições aeróbicas o lactato pode ser um substrato de grande valia para os neurônios. Na presença de oxigênio, o lactato é convertido a piruvato e transformado em ATP através do ciclo do ácido tricarboxílico associado à fosforilação oxidativa, sendo capaz de gerar 17 moléculas de ATP por molécula de lactato. Dados indicam que *in vitro* o lactato pode manter a transmissão e a atividade sináptica na ausência da glicose (MAGISTRETTI e PELLERIN, 1999).

Estudos têm mostrado que tanto no músculo esquelético quanto no sistema nervoso central, mais especificamente em astrócitos e neurônios, existem transportadores de lactato conhecidos como transportadores monocarboxilados. Assim, o acúmulo e a futura utilização do lactato como fonte energética são acontecimentos de grande importância nas primeiras horas dos períodos pré e pós-natal.

Os benefícios do parto normal puderam ser avaliados, principalmente, com relação à capacidade dos neonatos, após o término do período de recuperação, em diminuir a lactacidemia. Nos estudos realizados por Herrera-Maschitz et al. (2010) dados como a coloração da pele, vocalização, tônus muscular, padrão ventilatório e movimentos espontâneos compõem o índice de Apgar para roedores, o qual pode ser utilizado como parâmetro para determinar a porcentagem de sobrevivência e recuperação. É descrito que a taxa de sobrevivência dos animais nascidos de parto normal não difere da dos animais controle nascidos de parto cesáreo, porém os animais nascidos de parto normal apresentam uma maior movimentação de todas as estruturas do corpo.

O maior vigor encontrado nos filhotes nascidos de parto normal pode estar relacionado com a estimulação tátil durante a passagem dos fetos pelo canal vaginal, a qual pode causar uma elevação no lactato plasmático. Esse aumento pode ser visto como um mecanismo

fisiológico protetor, provendo o cérebro neonatal com um importante substrato energético (VAILLANCOURT et al., 1999). Porém, em determinadas situações causadoras de grande estresse e com períodos prolongados como na asfíxia perinatal, o lactato parece não ter desempenhado a função de fonte energética.

7 CONCLUSÃO

Os resultados experimentais indicam que a metodologia utilizada para submeter os fetos a um processo de asfixia perinatal foi capaz de gerar alterações nos parâmetros fisiológicos, os quais são semelhantes aos encontrados em publicações prévias.

Os animais submetidos a 15 minutos de asfixia intra-uterina apresentaram uma quantidade significativamente maior de lactato plasmático em relação aos respectivos controles, imediatamente após a histerectomia e quando a mesma foi obtida após um período de 60 minutos de recuperação. Esse resultado indica que os animais asfixiados não foram capazes de reverter a acidose metabólica, e sugere que não utilizaram o lactato como substrato energético.

Os filhotes nascidos de parto normal apresentaram grande habilidade em reduzir os níveis de lactato plasmático, fato que os diferencia dos neonatos controle de parto cesáreo. A lactacidemia materna apresentou aumento significativo no grupo submetido ao parto cesáreo em relação às mães que tiveram filhotes nascidos de parto normal. Não identificamos diferença na concentração de lactato nas placentas dos neonatos controle e na placenta dos recém nascidos de parto normal, porém houve um aumento expressivo no lactato das placentas do grupo asfixiado.

Dessa forma, o aumento na concentração de lactato pode ser visto como um mecanismo fisiológico protetor, provendo o cérebro neonatal com um importante substrato energético. Porém, em determinadas situações, como na asfixia perinatal, o lactato parece não ter desempenhado a função de fonte energética.

Com a metodologia e os recursos utilizados no estudo, não foi possível responder a muitas dúvidas surgidas no decorrer dos experimentos. É necessário realizarmos mais estudos para que possamos identificar quais rotas estejam envolvidas na captação do lactato plasmático em neonatos, bem como identificar quais fenômenos bioquímicos foram suprimidos ou alterados no metabolismo do recém nascido de parto cesáreo.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-SPILBURY, M. et al. Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 1-30, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=ALONSO-SPILBURY%2C%20M.%20et%20al.%20Perinatal%20asphyxia%20pathophysiology%20in%20pig%20and%20human%3A%20A%20review.%20Animal%20Reproduction%20Science%2C%20v.%2090%2C%20p.%201-30%2C%202005>. Acesso em: 11 de fevereiro 2011.
- BASU, P. et al. Contribution of the blood glucose level in perinatal asphyxia. **European Journal of Pediatrics**, v. 168. p. 833 – 838, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=BASU%2C%20P.%20et%20al.%20Contributio%20of%20the%20blood%20glucose%20level%20in%20perinatal%20asphyxia.%20Europea%20Journal%20of%20Pediatrics%2C%20v.%20168.%20p.%20833%20E2%80%93%20838%2C%202009>. Acesso em: 05 de maio 2011.
- BENNET, L. et al. The cerebral hemodynamic response to asphyxia and hypoxia in the near-term fetal sheep as measured by near infrared spectroscopy. **Pediatric Research**, v. 44. p.951 – 957, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=BENNET%2C%20L.%20et%20al.%20The%20cerebral%20hemodynamic%20response%20to%20asphyxia%20and%20hypoxia%20in%20th%20e%20nearterm%20fetal%20sheep%20as%20measured%20by%20near%20infrared%20spectr%20scopy.%20Pediatric%20Research%2C%20v.%2044.%20p.%20951%20E2%80%93%20957%2C%201998>. Acesso em: 16 de fevereiro 2011.
- BISHAI, JM. et al. Fetal lamb cerebral blood flow (CBF) and oxygen tensions during hypoxia: a comparison of laser Doppler and microsphere measurements of CBF. **Journal of Physiology**, v.552, p.869–878, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=BISHAI%2C%20JM.%20et%20al.%20Fetal%20lamb%20cerebral%20blood%20flow%20and%20oxygen%20tensions%20during%20hypoxi%20a%3A%20a%20comparison%20of%20laser%20Doppler%20and%20microsphere%20measur%20ements%20of%20CBF.%20Journal%20of%20Physiology%2C%20v.%20552%2C%20p.%20869%20E2%80%93%20878%2C%202003>. Acesso em: 09 de fevereiro 2011.
- BJELKE, B. et al. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase immunoreactivity nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. **Brain Research**, v.543, p.1-9,1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=BJELKE%2C%20B.%20et%20al.%20Asphycti%20c%20lesion%3A%20proliferation%20of%20tyrosine%20hydroxylase%20immunoreactivity%20nerve%20cell%20bodies%20in%20the%20rat%20substantia%20nigra%20and%20function%20al%20changes%20in%20dopamine%20neurotransmission.%20Brain%20Research%2C%20v.%20543%2C%20p.%201-9%2C%201991>. Acesso em: 20 de março 2011.
- BORRUTO, F. et al. Screening of fetal distress by assessment of umbilical cord lactate. **Clinical and Experimental Obstetrics Gynecology**, v.33, n.4, p. 219-222, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=BORRUTO%2C%20F.%20et%20al.%20Scree%20ning%20of%20fetal%20distress%20by%20assessment%20of%20umbilical%20cord%20lacta>

te.%20Clinical%20and%20Experimental%20Obstetrics%20Gynecology%2C%20v.33%2C%20n.4%2C%20p.%20219-222%2C%202006>. Acesso em: 17 de abril 2011.

BOUTILIER, RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 3171–3181, 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=BOUTILIER%2C%20RG.%20Mechanisms%20of%20cell%20survival%20in%20hypoxia%20and%20hypothermia.%20The%20Journal%20of%20Experimental%20Biology%2C%20v.%20204%2C%20p.%203171%E2%80%933181%2C%202001>>. Acesso em: 14 de abril 2011.

Burd LI; Jones, MD Jr; Simmons, MA; Makowski, EL; Meschia, G; Battaglia, FC.(1975). Placental production and fetal utilization of lactate and pyruvate. **Nature**, v. 254, p. 710–711, 1975.

CARSTENSEN, MH; LEICHTWEISS, HP; SCHRODER, H. Lactate carriers in artificially perfused human term placenta. **Placenta**, v. 4, p.165–174, 1983.

CHIH, CP; LIPTON, P; ROBERTS, EL JR. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? **Trends in Neuroscience**, v. 24, p. 573–578, 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=CHIH%2C%20CP%3B%20LIPTON%2C%20P%3B%20ROBERTS%2C%20EL%20JR.%20Do%20active%20cerebral%20neurons%20really%20use%20lactate%20rather%20than%20glucose%3F%20Trends%20in%20Neuroscience%2C%20v.%2024%2C%20p.%20573%E2%80%93578%2C%202001>>. Acesso em: 25 de janeiro 2011.

DESHPANDE, SA; PLATT, MP. Association between blood lactate and acid-base status and mortality in ventilated babies. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, ed: 76, p. 15-20, 1997. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=DESHPANDE%2C%20SA%3B%20PLATT%2C%20MP.%20Association%20between%20blood%20lactate%20and%20acid-base%20status%20and%20mortality%20in%20ventilated%20babies.%20Archives%20of%20disease%20in%20childhood.%20Fetal%20and%20neonatal%20edition%2C%20ed%3A%2076%2C%20p.%2015-20%2C%201997>>. Acesso em: 06 de março 2011.

DUFFY, TE; KOHLE, SJ; VANNUCCI, RC. Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: relation to survival in anoxia. **Journal of Neurochemistry**, v. 24, p. 271–276, 1975.

FIELD, DR. et al. Cerebral oxygen consumption during asphyxia in fetal sheep. **Journal of Developmental Physiology**, v.14, p. 131–137, 1990.

FRIZZO, JK. et al. Effects of acute perinatal asphyxia in the rat hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, p. 683-692, 2010. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=FRIZZO%2C%20JK.%20et%20al.%20Effects%20of%20acute%20perinatal%20asphyxia%20in%20the%20rat%20hippocampus.%20Cellular%20and%20Molecular%20Neurobiology%2C%20v.%2030%2C%20p.%20683-692%2C%202010>>. Acesso em: 20 de março 2011.

GLEASON, CA. et al. Lactate uptake by a fetal sheep liver. **Journal of Developmental Physiology**, v.7, p. 177-183, 1985.

GUNN, AJ. et al. The premature fetus: not as defenseless as we thought, but still paradoxically vulnerable? **Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 175-179, 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=GUNN%2C%20AJ.%20et%20al.%20The%20remature%20fetus%3A%20not%20as%20defenseless%20as%20we%20thought%2C%20but%20still%20paradoxically%20vulnerable%3F%20Developmental%20Neuroscie>

HERMANSEN, MC. The acidosis paradox: asphyxial brain injury without coincident acidemia. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 45, p. 353-356, 2003.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8749.2003.tb00408.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+2+July+from+10-12+BST+for+monthly+maintenance>>. Acesso em: 14 de abril 2011.

HERRERA-MARSCHITZ, M. et al. Prevention of mortality induced by perinatal asphyxia: hypothermia or glutamate antagonism? **Amino Acids**, v. 5, p. 413-419, 1993.

HERRERA-MARSCHITZ, M. et al. Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. **Neurotoxicity Research**, v.19, p. 603-619, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=HERRERA-MARSCHITZ%2C%20M.%20et%20al.%20Perinatal%20asphyxia%3A%20current%20status%20and%20approaches%20towards%20neuroprotective%20strategies%2C%20with%20focus%20on%20sentinel%20proteins.%20Neurotoxicity%20Research%2C%20v.19%2C%20p.%20603-619%2C%202011>>. Acesso em: 05 de junho 2011.

HOCHACHKA, PW; LUTZ, PL. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Biochemistry and Molecular Biology**, v. 130, p. 435 - 459, 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=HOCHACHKA%2C%20PW%3B%20LUTZ%2C%20PL.%20Mechanism%2C%20origin%2C%20and%20evolution%20of%20anoxia%20tolerance%20in%20animals.%20Comparative%20Biochemistry%20and%20Physiology.%20Biochemistry%20and%20Molecular%20Biology%2C%20v.%20130%2C%20p.%20435%20-%20459%2C%202001>>. Acesso em: 18 de novembro 2010.

HOHIMER, AR; CHAO, CR; BISSONNETTE, JM. The effect of combined hypoxemia and cephalic hypotension on fetal cerebral blood flow and metabolism. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 11, p. 99-105, 1991. Disponível em:

<<http://www.nature.com/jcbfm/journal/v11/n1/pdf/jcbfm199111a.pdf>>. Acesso em: 06 de novembro 2010.

HOLZMAN, IR; PHILIPPS, AF; BATTAGLIA, FC. Glucose metabolism, lactate and ammonia production by the human placenta *in vitro*. **Pediatric Research**, v. 13, p.117-120, 1979.

HUNTER, CJ. et al. A key neuroprotective role for endogenous adenosine A1 receptor activation during asphyxia in the fetal sheep. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 34, p. 2240 -2245, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=HUNTER%2C%20CJ.%20et%20al.%20A%20key%20neuroprotective%20role%20for%20endogenous%20adenosine%20A1%20receptor%20activation%20during%20asphyxia%20in%20the%20fetal%20sheep.%20Stroke%3B%20a%20Journal%20of%20Cerebral%20Circulation%2C%20v.%2034%2C%20p.%202240%20-2245%2C%202003>>. Acesso em: 13 de maio 2011.

HUNTER, CJ; BLOOD, AB; POWER, GG. Cerebral metabolism during cord occlusion and hypoxia in the fetal sheep: a novel method of continuous measurement based on heat production. **Journal of Physiology**, v. 552, p. 241–251, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2343310/pdf/tjp0552-0241.pdf>>. Acesso em: 13 de maio 2011.

JENSEN, A; GARNIER, Y; BERGER R. Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. **European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology**, v. 84, p. 155–172, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=JENSEN%2C%20A%3B%20GARNIER%2C%20Y%3B%20BERGER%20R.%20Dynamics%20of%20fetal%20circulatory%20responses%20to%20hypoxia%20and%20asphyxia.%20European%20Journal%20of%20Obstetrics%20Gynecology%20Reproductive%20Biology%2C%20v.%2084%2C%20p.%20155%20-172%2C%201999>>. Acesso em: 12 de abril 2011.

JONES, MD JR. et al. Regulation of cerebral blood flow in the ovine fetus. **The American Journal of Physiology**, v. 235, p. 162–166, 1978. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=JONES%2C%20MD%20JR.%20et%20al.%20Regulation%20of%20cerebral%20blood%20flow%20in%20the%20ovine%20fetus.%20The%20American%20Journal%20of%20Physiology%2C%20v.%20235%2C%20p.%20162%20-166%2C%201978>>. Acesso em: 19 de maio 2011.

KRUGER, K. et al. Predictive value of fetal scalp blood lactate concentration and pH as markers of neurologic disability. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181 p. 1072-1078, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=KRUGER%2C%20K.%20et%20al.%20Predictive%20value%20of%20fetal%20scalp%20blood%20lactate%20concentration%20and%20pH%20as%20markers%20of%20neurologic%20disability.%20American%20Journal%20of%20Obstetrics%20and%20Gynecology%2C%20v.%20181%20p.%201072-1078%2C%201999>>. Acesso em: 19 de maio 2011.

LAWN, J. E.; COUSENS, S.; ZUPAN, J. 4 million neonatal deaths: when? where? why? **Lancet**, v. 365, n. 9462, p. 891- 900, 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=LAWN%2C%20J.E.%3B%20COUSENS%2C%20S.%3B%20ZUPAN%2C%20J.%204%20million%20neonatal%20deaths%3A%20when%3F%20where%3F%20why%3F%20Lancet%2C%20v.%20365%2C%20n.%209462%2C%20p.%20891-900%2C%202005>>. Acesso em: 22 de outubro 2010.

LUST, W.D. et al. Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal and adult rat brain. **Metabolic Brain Disease**, v. 18, n. 3, p. 195-206, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=LUST%2C%20W.D.%20et%20al.%20Changin%20metabolic%20and%20energy%20profiles%20in%20fetal%2C%20neonatal%20and%20adult%20rat%20brain.%20Metabolic%20Brain%20Disease%2C%20v.%2018%2C%20n.%203%2C%20p.%20195-206%2C%202003.%20%20>. Acesso em: 03 de maio 2011.

MARCONI, AM. et al. Lactate metabolism in normal and growth-retarded human fetuses. **Pediatric Research**, v. 28, p. 652-656, 1990.

MAYOR, F. Cambios hormonales y integración metabólica durante el período perinatal. In: HERRERA, Emilio. **Bioquímica perinatal: aspectos basicos y patológicos**. Madri: Ceura, 1988. cap. 9, p. 187-198.

NORDSTROM, L; INGEMARSSON, I; WESTGREN, M. Fetal monitoring with lactate. **Baillieres Clinical Obstetrics Gynaecology**, v. 10, p. 225-242, 1996. Disponível em:

POLIT, D.F; BECK, C.T; HUNGLER, B.P. **Fundamentos de pesquisa em enfermagem: métodos, avaliação e utilização**. 5.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.

PRIETO, M. P. Estructura de la placenta y transferencia placentaria de metabolitos. In: HERRERA, Emilio. **Bioquímica perinatal: aspectos basicos y patológicos**. Madri: Ceura, 1988. cap. 3, p. 66-89.

ROHLICEK, CV. et al. Oxygen transport in conscious newborn dogs during hypoxic hypometabolism. **Journal Applied Physiology**, v. 84, p. 763-768, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9480931>. Acesso em: 23 de novembro 2010.

SILVA, S. et al. Clinical value of a single postnatal lactate measurement after intrapartum asphyxia. **Acta Paediatrica**, v. 89, p. 320-323, 2000. Acesso em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=SILVA%2C%20S.%20et%20al.%20Clinical%20value%20of%20a%20single%20postnatal%20lactate%20measurement%20after%20intrapartum%20asphyxia.%20Acta%20Paediatrica%2C%20v.%2089%2C%20p.%20320-323%2C%202000>. Acesso em: 06 de junho 2011.

SINGER, D. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative physiological approach. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v. 123, p. 221-234, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=SINGER%2C%20D.%20Neonatal%20tolerance%20to%20hypoxia%3A%20a%20comparative%20physiological%20approach.%20Comparative%20Biochemistry%20and%20Physiology.%20Part%20A%2C%20Molecular%20and%20Integrative%20Physiology%2C%20v.%20123%2C%20p.%20221%E2%80%93234%2C%201999>. Acesso em: 17 de novembro 2010.

SPARKS, JW. et al. Simultaneous measurements of lactate turnover rate and umbilical lactate uptake in the fetal lamb. **Journal of Clinical Investigation**, v. 70, p. 179-192, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=SPARKS%2C%20JW.%20et%20al.%20%20Si>

multaneous%20measurements%20of%20lactate%20turnover%20rate%20and%20umbilical%20lactate%20uptake%20in%20the%20fetal%20lamb.%20Journal%20of%20Clinical%20Investigation%2C%20v.%2070%2C%20p.%20179%E2%80%93192%2C%201982>. Acesso em: 21 de maio, 2011.

STEMBERA, ZK; HODR, J. The relationship between the blood levels of glucose, lactic acid and pyruvic acid in the mother and in both umbilical vessels of the healthy fetus. **Biology Neonatal**, v. 10, p. 227–238, 1966.

SUIDAN, JS; WASSERMAN, JF; YOUNG, BK. Placental contribution to lactate production by the human fetoplacental unit. **American Journal of Perinatology**, v. 1, p. 306–309, 1984.

SUIDAN JS; YOUNG, BK. Outcome of fetuses with lactic acidemia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 150, p. 33-37, 1984. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=SUIDAN%2C%20JS%3B%20WASSERMAN%2C%20JF%3B%20YOUNG%2C%20BK.%20Placental%20contribution%20to%20lactate%20production%20by%20the%20human%20fetoplacental%20unit.%20American%20Journal%20of%20Perinatology%2C%20v.%201%2C%20p.%20306%E2%80%93309%2C%201984>>. Acesso em: 08 de maio 2011.

SUZUKI, S. et al. Hyperthermia prevents metabolic and cerebral flow responses to hypoxia in the fetal sheep. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, p. 45-50, 2000. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=SUZUKI%2C%20S.%20et%20al.%20Hyperthermia%20prevents%20metabolic%20and%20cerebral%20flow%20responses%20to%20hypoxia%20in%20the%20fetal%20sheep.%20Journal%20of%20the%20Society%20for%20Gynecologic%20Investigation%2C%20v.%207%2C%20p.%2045%E2%80%9350%2C%202000>>. Acesso em: 18 de dezembro 2010.

VAN CAPPELLEN, AM. et al. Hypoxia, the subsequent systemic metabolic acidosis, and their relationship with cerebral metabolite concentrations: an in vivo study in fetal lambs with proton magnetic resonance spectroscopy. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 181, p. 1537–1545, 1999.

VANNUCCI, RC; DUFFY, TE. Carbohydrate metabolism in fetal and neonatal rat brain during anoxia and recovery. **American Journal of Physiology**, v. 230, p. 1269-1275, 1976. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=VANNUCCI%2C%20RC%3B%20DUFFY%2C%20TE.%20Carbohydrate%20metabolism%20in%20fetal%20and%20neonatal%20rat%20brain%20during%20anoxia%20and%20recovery.%20American%20Journal%20of%20Physiology%2C%20v.%20230%2C%20p.%201269-1275%2C%201976>>. Acesso em: 23 de fevereiro 2011

VAILLANCOURT, C; BERGER, N; BOKSA, P. Effect of vaginal birth versus caesarean section birth with general anesthesia on blood gases and brain energy metabolism in neonatal rats. **Experimental Neurology**, v.160, p. 142-150, 1999. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630199>>. Acesso em: 23 de novembro 2010.

VILLAPOL, S. et al. Astrocyte responses after neonatal ischemia: the yin and the yang. **The Neuroscientist**, v.14, n. 4, p. 339-344, 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=VILLAPOL%2C%20S.%20et%20al.%20Astrocyte%20responses%20after%20neonatal%20ischemia%3A%20the%20yin%20and%20the%20yang.%20The%20Neuroscientist%2C%20v.14%2C%20n.%204%2C%20p.%20339-344%2C%202008.%20>>. Acesso em: 17 de dezembro 2010

WEITZDOERFER, R; POLLAK, A; LUBEC, B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. **Seminars in Perinatology**, v. 28, n. 4, p. 249-256, 2004.

**UFRGS**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO****Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:****Número:** 18335**Título:** ESTUDO COMPARATIVO DOS NÍVEIS DE LACTATO MATERNO, PLACENTÁRIO E FETAL NO PARTO NATURAL OU CESÁREO COM E SEM ASFIXIA INTRAUTERINA**Pesquisadores:****Equipe UFRGS:**

MARCOS EMILIO DOS SANTOS FRIZZO - coordenador desde 01/08/2010

SAMIR KHAL DE SOUZA - pesquisador desde 01/08/2010

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 06/06/2011 - Sala da Propesq do Prédio da Ex-Química, no Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 14 de Junho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética