

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Avaliação da via do VEGFR1 e VEGFR2 no modelo experimental de asfixia neonatal em ratos ventilados”

Anderson Rosário Prado

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Avaliação da via do VEGFR1 e VEGFR2 no modelo experimental de asfixia neonatal em ratos ventilados”.

Anderson Rosário Prado

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Co-orientadora: Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo Figueira

RIBEIRÃO PRETO – SP
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Prado, Anderson Rosário

Avaliação da via do VEGFR1 e VEGFR2 no modelo experimental de asfixia neonatal em ratos ventilados. Ribeirão Preto, 2016.

Monografia apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientador: Sbragia Neto, Lourenço

1. Asfixia neonatal. 2. VEGFR2. 3. VEGFR1. 4. Ventilação mecânica.

P A R E C E R

O trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas que se intitula “Avaliação da via do VEGFR1 e VEGFR2 no modelo experimental de asfixia neonatal em ratos ventilados”

O aluno obteve a nota () com distinção e louvor.

Ribeirão Preto, 29 de junho de 2016.

Ma. Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo Figueira

Co-orientadora e Presidente da Banca Examinadora - FMRP

Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

DB-FFLCRP

Prof. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi

DB-FFLCRP

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Angela Regina Rosário Prado e Jefferson Prado,
por todo apoio e investimento em meu
crescimento pessoal e profissional.**

AGRADECIMENTOS:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Pela oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal e por todos os cuidados e suporte prestados durante os anos de trabalho.

Aos meus pais Jefferson Prado e Angela Regina Rosário Prado e à minha irmã Mariana Rosário Prado

Por serem as bases fortes da minha vida e os pilares que me sustentaram durante todo o meu desenvolvimento como homem, e por serem meus maiores exemplos de vida.

À minha namorada Renata Bortoleto da Silveira

Pelo amor incondicional, pelo companheirismo, pelos tão valiosos conselhos e por ter sido minha maior motivadora diante das dificuldades encontradas no caminho.

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Por ter me apresentado à Embriologia, por todo o suporte em meu intercâmbio, pela viabilização de minha primeira Iniciação Científica e por ser o meu maior exemplo de docência, respeito e amizade que tive na Universidade.

À amiga Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo Figueira

Por todo o tempo, paciência e ajuda dispensados durante todo o trabalho e pelos ensinamentos que levarei para toda vida.

À Dra. Frances Lilian Lanhellas Gonçalves e à Sandra Lúcia B. Penharvel Martins

Pelos ensinamentos, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade que foram fundamentais para o prosseguimento do trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda da Rocha Brando Fernandes

Pela amizade, pelo carinho e pela tão produtiva orientação durante o Projeto Teia Verde de extensão universitária.

Aos meus grandes amigos

Paulo Guilherme Xavier, Luciano Toniolo, Felipe Augusto, Caio César Damasceno, João Pedro Trevisan, Danilo Sasso Augusto, Gabriel dos Santos Paulon, Wendy Ishimoto, Marcela Oliveira da Silva, Carla Kuhl, à 49ª turma da Biologia e a todos os outros que foram fundamentais durante meu percurso na Universidade.

À toda minha família

Pelo amor, carinho, respeito e por serem muitas vezes a maior representação de tranquilidade e paz diante das adversidades e das agruras da vida acadêmica.

À Deus

Pelo amparo, pelo amor e por ser a minha maior resposta diante das dúvidas e incertezas que nenhuma ciência é capaz de responder.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

A asfixia neonatal (AN) é uma enfermidade caracterizada por inibição respiratória, responsável por cerca de 23% da taxa mundial de mortalidade neonatal. A asfixia neonatal ocorre por episódios hipóxico-isquêmicos que são definidos como redução do nível sérico de oxigênio e de fluxo sanguíneo, e acarretam complicações multissistêmicas ao organismo. Os quadros hipóxico-isquêmicos levam à super produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) altamente tóxicas e geram lesões teciduais por morte celular. As ERO's são responsáveis pela indução da angiogênese, que tem como principais mediadores, os receptores tirosino-quinase de *vascular endothelial growth factor* (VEGF): VEGFR2 e VEGFR1. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão pulmonar de VEGFR2 e VEGFR1 em ratos neonatos submetidos a modelo de asfixia neonatal e ventilação mecânica, além de verificar uma possível influência da asfixia na espessura da camada média das arteríolas pré-acinares no pulmão. Foram utilizados neonatos de ratos *Sprague-Dawley* subdivididos em quatro grupos: Controle (C), Controle Ventilado (CV), Asfixia (A) e Asfixia Ventilado (AV). Foram realizadas análises do peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT) e do peso pulmonar total em relação ao peso corporal (PPT/PC), análises da morfometria vascular através da espessura da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares de resistência, e imunoistoquímica. Na análise biométrica foi possível observar que o PPT do grupo AV foi significativamente menor do que os grupos C e A ($p<0,05$). Na análise da morfometria vascular foi observado um aumento de ECM no grupo A comparado aos demais grupos ($p<0,05$). Através da imunoistoquímica verificou-se maior expressão de VEGFR2 no grupo A em relação aos demais grupos ($p<0,05$). O grupo A também apresentou expressão significativamente menor de VEGFR1 comparado aos grupos CV e AV ($p<0,05$) e maior comparado ao grupo C ($p<0,05$). Dessa forma, conclui-se que no modelo de asfixia neonatal em ratos a termo, a asfixia seguida de ventilação mecânica altera a morfologia, morfometria vascular e as vias receptoras de VEGF pulmonar, apresentando significativo aumento da ECM e alteração na expressão dos receptores tirosino-quinases VEGFR1 e VEGFR2 responderam inversamente proporcional aos estímulos hipóxico-isquêmicos.

Palavras-chave: asfixia neonatal, hipóxia, ventilação mecânica, VEGFR2, VEGFR1, angiogênese, ERO's.

Lista de abreviaturas:

A: Grupo asfixia

AAP: Academia Americana de Pediatria

AN: Asfixia neonatal

ATP: adenosina trifosfato

AV: Grupo asfixia ventilado

BSA: Albumina Bovina Sérica

C: Grupo controle

CV: Grupo controle ventilado

DAB: 3,3'- diaminobenzidino-tetra-hidrocloreto

ECM: espessura da camada média

ERO's: espécies reativas de oxigênio

DNA: ácido desoxirribonucleico

GABA: ácido gama-aminobutírico

Hb: hemoglobina

HIF2 α : hypoxia-inducible fator 2 α

Ipm: inclusões por minuto

n: número de amostra

NO: óxido nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

paO₂: pressão parcial de oxigênio

PBS: Tampão fosfato salina

PC: Peso corporal

PPT: Peso pulmonar total

PPT/PC: Razão Peso pulmonar total/Peso corporal

PVR: Resistência vascular pulmonar

RNA_m: ácido ribonucleico mitocondrial

SOD: enzima superóxido-dismutase

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR1: Receptor 1 do fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR2: Receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial

Lista de notações:

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

®: Marca Registrada

cm: centímetro

µL: microlitro

µm: micrômetro

G: Gauge – calibre da agulha

kDa: kilodáton

M: Molar

mm: milímetro

mmHg: milímetro de Mercúrio

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

n: Número da amostra

ipm: inclusões por minuto

nm: nanômetro

pH: Potencial de Hidrogênio

u.a.: unidade arbitrária

Lista de Tabelas:

TABELA 1. Média e desvio-padrão do peso corporal (PC), do peso pulmonar total (PPT), da relação PPT/PC (n=8 por grupo).

TABELA 2. Média e desvio-padrão da espessura da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares de resistência.

TABELA 3. Média e desvio-padrão do escore de imunomarcção de VEGFR2 e VEGFR1 através de análise imunoistoquímica.

TABELA 4. Resultados das avaliações biométricas do grupo AV.

TABELA 5. Resultados das avaliações biométricas do grupo A.

TABELA 6. Resultados das avaliações biométricas do grupo C.

TABELA 7. Resultados das avaliações biométricas do grupo CV.

TABELA 8. Resultados das avaliações da morfometria vascular das arteríolas pré-acinares de resistência. Valores da espessura da camada média (ECM).

TABELA 9. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo AV.

TABELA 10. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo A.

TABELA 11. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo C.

TABELA 12. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo CV.

TABELA 13. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo AV.

TABELA 14. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo A.

TABELA 15. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo C.

TABELA 16. Resultado do escore da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo CV.

Lista de Figuras:

FIGURA 1 - Cascata da hipoxantina para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no processo hipóxia/reoxigenação. FONTE: Rodrigues F. P. M, 1998 (Adaptado).

FIGURA 2 – Esquema de estudo do projeto. C: Controle; CV: Controle Ventilado; A: Asfixia; AV: Asfixia ventilado.

FIGURA 3 – **A:** Rata posicionada em decúbito dorsal sob cama térmica à 37°C. **B, C:** Lapartomia mediana. **D:** Exposição dos cornos uterinos com fetos.

FIGURA 4 –Câmara anóxica de acrílico com tampa e fluxo de N₂ a 35L/min.

FIGURA 5 – **A)** Feto posicionado em decúbito dorsal sobre mesa aquecida (em média 38°C) e fixados com fita adesiva. **B)** Realização de incisão cervical anterior. **C)** Feto entubado com cateter de teflon e ventilado. **D)** Visão lateral do recém nascido sendo ventilado.

FIGURA 6 – Respirador ciclado à volume (MiniVent type 845, Harvard Apparatus®, Alemanha), a um volume de 75μL e frequência de 80 incursões por minuto (ipm).

FIGURA 7 – **A)** Modelo de fotografia de campo pulmonar em aumento de 200x. **B)** Exemplo de medição do diâmetro externo (DE) (linha verde) e diâmetro interno (DI) (linha azul)

FIGURA 8 – **A)** Banhos de xilol e álcoois em níveis decrescentes de concentração. **B)** Panela elétrica à vapor para recuperação antigênica. **C)** Câmara escura úmida.

FIGURA 9 – Gráficos do PC (Peso Corporal), PPT (Peso Pulmonar Total), PPT/PC (razão Peso Pulmonar Total/Peso Corporal) dos grupos estudados. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixia. **AV:** Asfixia Ventilado.

FIGURA 10 – Arteriolas pré-acinares de resistência coradas por Tricrômio de Masson. Linhas tracejadas destacam a camada média arteriolar (ECM). Notar maior ECM no grupo A. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixia. **AV:** Asfixia Ventilado (Barra de escala = 50µm). Aumento de 400X.

FIGURA 11 – Imunoistoquímica para VEGFR2 dos grupos estudados. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixia. **AV:** Asfixia Ventilado. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

FIGURA 12 – Controle negativo da Imunoistoquímica para VEGFR2. **CN:** Controle Negativo. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

FIGURA 13 – Imunoistoquímica para VEGFR1 dos grupos estudados. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixia. **AV:** Asfixia Ventilado. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

FIGURA 14 – Controle negativo da Imunoistoquímica para VEGFR1. **CN:** Controle Negativo. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

Lista de Gráficos:

GRÁFICO 1. Espessura da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares de resistência. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixiado. **AV:** Asfixiado Ventilado. Observar maior espessura da camada média (ECM) no grupo A comparado aos demais grupos. ****** $p < 0,005$. ***** $p < 0,05$.

GRÁFICO 2. Análise da expressão de VEGFR2 no pulmão por imunoistoquímica. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixiado. **AV:** Asfixiado Ventilado. Observar maior expressão de VEGFR2 no grupo A comparado aos demais grupos. ****** $p < 0,005$. ***** $p < 0,05$.

GRÁFICO 3. Análise da expressão de VEGFR1 no pulmão por imunoistoquímica. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixiado. **AV:** Asfixiado Ventilado. Observar menor expressão de VEGFR1 no grupo C comparado aos demais grupos e a menor expressão em A comparado aos grupos **CV** e **AV**. ****** $p < 0,005$. ***** $p < 0,05$.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	10
3. MATERIAS E MÉTODOS	12
3.1. Avaliação do comitê de ética em experimentação animal	12
3.2. Animais e obtenção de fêmeas prenhes.....	12
3.3. Composição dos grupos amostrais	12
3.4. Coleta de amostras	13
3.5. Indução da asfixia.....	14
3.6. Ventilação pulmonar	15
3.7. Avaliação biométricas dos fetos e órgãos	17
3.8. Processamento histológico para análise morfométrica e imunoistoquímica	17
3.9. Análise da morfometria vascular	17
3.10. Imunoistoquímica para VEGFR2 e VEGFR1	18
3.11. Análise semiquantitativa da imunoistoquímica	19
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5. RESULTADOS	23
5.1 Análise Biométrica.....	23
5.2 Análise da morfometria vascular	25
5.3 Imunoistoquímica para VEGFR2 e VEGFR1	26
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9. APÊNDICES	45

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A asfixia neonatal (AN) é uma complicação obstétrica com alta taxa de mortalidade que acomete grande porcentagem de recém-nascidos no mundo (1). Ela pode ser definida como a inibição respiratória acarretada por episódios hipóxico-isquêmicos que geram morte celular e lesões teciduais (2). A hipóxia é caracterizada pela redução de níveis séricos de oxigênio enquanto que a isquemia é caracterizada pela redução do fluxo sanguíneo no organismo (3-8). Observa-se na literatura uma grande diversidade de definições para asfixia neonatal. Para tanto se faz necessária a utilização de critérios mais rigorosos para definição por influenciar diretamente os diagnósticos da doença (9).

Os eventos hipóxico/isquêmicos que acarretam em asfixia possuem causas que variam desde a imaturidade do sistema neurológico até a uma oxigenação inapropriada durante a ventilação mecânica a qual o recém-nascido asfixiado é submetido (8,10). No momento do nascimento, o neonato tem de se adaptar a um meio com concentrações de oxigênio totalmente distintas do meio intrauterino no qual ocorreu o seu desenvolvimento. Uma possível ineficácia no início dos movimentos respiratórios pode ser outro fator fatal e causar hipóxia e isquemia e levar à AN (11).

Inúmeros fatores podem ser considerados de alto risco para a ocorrência de hipóxia e isquemia. Dentre eles, podemos citar: compressão do cordão umbilical, ruptura da placenta, aspiração de mecônio, disfunções do ventrículo esquerdo do coração, defeitos de coagulação, diabetes e toxemia materna, complicações que resultam em aumento da resistência vascular placentária, como insuficiência placentária, pré-eclâmpsia ou outras condições inflamatórias durante a gravidez (3, 5, 7, 10, 12). Além destes, nascimento prematuro, caracterizado por ocorrer antes de se completarem 37 semanas de gestação, é considerado um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento do quadro (13).

Embora haja intensos esforços para o desenvolvimento de cuidados pré-natais mais eficazes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que todo ano cerca de 4 a 9 milhões de recém-nascidos sofram de AN (14). Esse dado indica que 2 a 6 para cada mil nascimentos possuem AN no mundo. Devido à existência de fatores de risco como a falta de cuidados pré-natais e a alta taxa de nascimentos prematuros, as taxas de incidência da AN tendem a ser mais elevadas em países em desenvolvimento (8, 9, 15, 16).

Ainda dados da OMS, estima-se que 23% da taxa mundial de mortalidade neonatal se deva à AN, representando aproximadamente 1,2 milhões de mortes por ano (6). Dentre os recém-nascidos com AN, aproximadamente 45% morrem e outros 25% apresentam déficits neurológicos permanentes (1, 17). Segundo os critérios diagnósticos da Academia Americana de Pediatria dos Estados Unidos (AAP), a AN pode ser atribuída à manifestações clínicas como a acidose metabólica, a cianose, o Índice de Apgar (0 a 3 no quinto minuto de vida), bem como manifestações neurológicas e disfunções orgânicas multissistêmicas (9, 12).

Durante o período embrionário, a disponibilidade de oxigênio dentro do útero é finita por ser limitada à placenta. Neste cenário, algumas adaptações da vida fetal foram altamente favoráveis, no sentido de que garantiram um suprimento de oxigênio superior à demanda metabólica do feto, assegurando uma significativa margem de segurança. Dentre tais adaptações está a capacidade de ligar maiores concentrações de oxigênio à hemoglobina fetal (Hb fetal) que por ter maior afinidade pelo O₂, dificulta a sua liberação a nível tecidual, garantindo aumento no fluxo sanguíneo basal para a maioria dos tecidos e o desligamento do oxigênio quando os tecidos fetais estiverem em baixas tensões de oxigênio. A capacidade de desviar a circulação fetal pelos ductos venoso e arterial, além da capacidade de bloquear processos consumidores de oxigênio, são outras adaptações que possibilitaram a otimização da disponibilidade de oxigênio para o feto (1, 45).

De modo geral, tais estratégias durante episódios de hipóxia aguda aumentam a eficiência de mecanismos compensatórios, possibilitando um menor consumo de oxigênio e uma maior extração do gás a partir da Hemoglobina. A Hb fetal, tem sua produção reduzida ao longo do desenvolvimento gestacional, atingindo apenas um terço do total de hemoglobinas no recém-nascido (45).

Os recém-nascidos por terem uma capacidade carreadora de oxigênio um pouco menor e uma rede neuronal ainda imatura possuem algumas peculiaridades durante a asfixia se comparados a indivíduos adultos. Enquanto que no adulto, a asfixia provoca um aumento da ventilação pulmonar por minuto, no recém-nascido, acarreta em respirações cíclicas seguidas de inibição que pode evoluir para quadros de parada respiratória, sequelas permanentes e morte (1).

As contrações uterinas que se ocorrem durante o trabalho de parto acontecem em um período de alta demanda de oxigênio da mãe e do fet, e provocam uma diminuição

do fluxo sanguíneo materno-placentário. Estes fatores levam a uma queda da saturação fetal de oxigênio que é bem suportada por fetos saudáveis. Entretanto, quando a PaO₂ e a saturação fetal são respectivamente inferiores a 20mmHg e 31%, ocorrem desacelerações tardias que podem ser bastante prejudiciais ao feto. Em episódios hipóxico-isquêmicos, tanto o feto quanto o recém nascido reagem centralizando o fluxo sanguíneo de modo a garantir o aporte para o cérebro, o coração e as supra-renais, em detrimento de pulmões e outros órgãos do corpo (12).

A amplitude dos danos hipóxico-isquêmicos aos órgãos vitais do recém-nascido é dependente do nível e da duração da asfixia neonatal e se estes se dão de forma que superem a capacidade de compensação fisiológica do indivíduo (6).

Com a persistência do quadro asfíxico, os movimentos respiratórios cessam e ocorre uma redução na frequência cardíaca e um aumento da pressão arterial para manter a perfusão cerebral. A isto, dá-se o nome de apnéia primária que normalmente pode ser contornada com a oferta de oxigenação suplementar e estímulo tátil na maioria dos recém nascidos. Se a asfixia persistir, o recém-nascido inicia movimentos respiratórios profundos (*gaspings*), a frequência cardíaca reduz e a pressão arterial diminui. A queda gradativa dos movimentos respiratórios, da frequência cardíaca e da pressão arterial caracteriza o quadro de apnéia secundária que torna ainda mais difícil o restabelecimento pela estimulação tátil (12).

Quando a asfixia é grave e prolongada pode resultar em morte celular e lesões teciduais. Desse modo, as lesões geradas em decorrência da asfixia neonatal variam podendo levar o indivíduo à complicações pulmonares como hipertensão e hemorragia, além de deficiências no desenvolvimento neurológico como retardo mental, déficits de aprendizado, epilepsia, paralisia cerebral e deficiências auditivas e visuais, e até mesmo ao óbito (1, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 18).

Conforme a gravidade e o grau de comprometimento multisistêmico do recém-nascido se faz de fundamental importância para a sobrevivência do indivíduo a restauração imediata do fluxo sanguíneo e da oxigenação. Entretanto, isso implica uma série de cuidados de modo que não contribua para a amplificação da lesão tecidual (2).

Dada a complexidade dos quadros clínicos, altos investimentos têm sido aplicados no desenvolvimento de novas técnicas obstétricas para o tratamento de recém-nascidos com AN. O manejo dos asfixiados pode ser bastante complicado devido ao envolvimento de muitos órgãos. Os primeiros cuidados a serem tomados devem ser para

sanar as condições que geraram o quadro hipóxico-isquêmico e proteger o indivíduo de complicações subseqüentes (10).

Tratamentos para a asfixia neonatal compreendem procedimentos farmacológicos e não farmacológicos. Dentre os procedimentos não farmacológicos empregados na asfixia neonatal, podemos citar a ventilação mecânica, a limpeza das vias aéreas, a ressuscitação e a hipotermia. Os procedimentos farmacológicos incluem o uso de moduladores de glutamato, monoaminas (dopamina, norepinefrina e serotonina), GABA (ácido gama-aminobutírico), adenosina e fatores de crescimento (15). Para a escolha do método de tratamento mais adequado em cada caso é de fundamental relevância a realização de exames ecocardiográficos, além de avaliações clínicas do paciente (10).

A ventilação mecânica é um tipo de tratamento indispensável e comumente utilizado para a ressuscitação e para a reoxigenação do recém-nascido asfíxiado. Entretanto, a ventilação pode ser prejudicial para a manutenção da homeostase ao manter a expressão de vias metabólicas alternativas o que leva a um aumento do déficit energético e do estresse oxidativo (8). A ventilação mecânica é, desde o séc. XX, utilizada como método de indução de alcalose metabólica e redução da resistência vascular pulmonar (PVR) na hipertensão pulmonar mesmo sem que houvesse evidências concretas que demonstrassem melhorias no quadro clínico dos neonatos (19, 20).

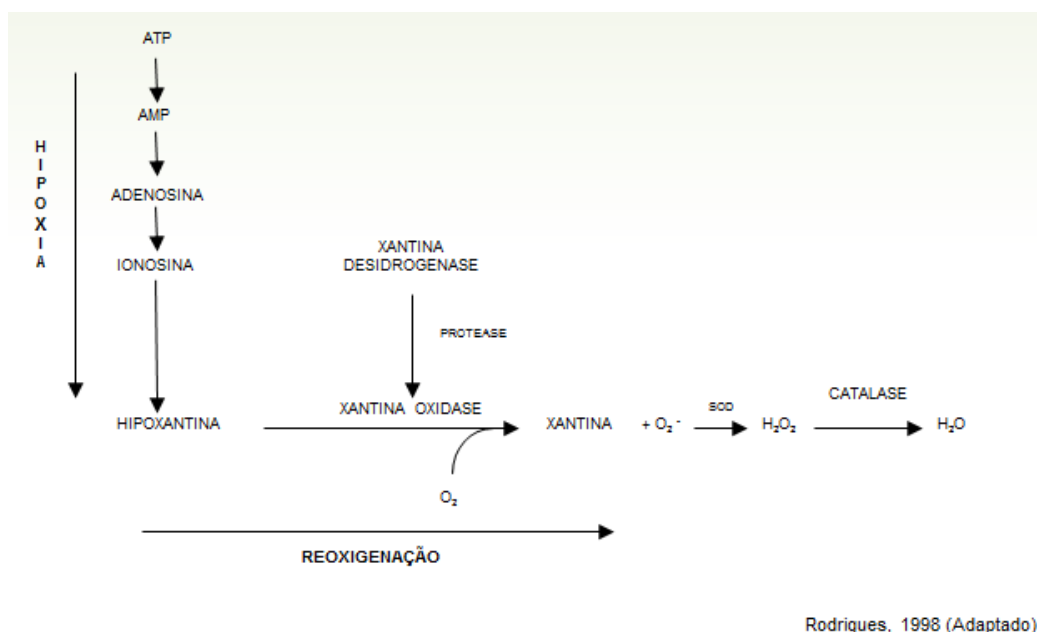
Atualmente sabe-se que a alcalose metabólica acarreta inúmeros efeitos adversos na função cardíaca e na pressão sistêmica que são extremamente prejudiciais ao recém-nascido asfíxiado. Desse modo a avaliação do volume funcional a ser aplicado em pacientes com inflamação pulmonar, necessita de cuidados minuciosos a fim de se evitar mais danos ao tecido e disfunções de outros órgãos (10, 21). A literatura carece de uma padronização da ventilação mecânica para modelos experimentais de asfixia neonatal, o que torna imprescindíveis mais estudos de modo a elucidar o volume ideal de ventilação para neonatos asfíxiados.

É conhecido que na ocorrência de hipóxia e da reoxigenação por ventilação mecânica, a mudança para um metabolismo anaeróbico leva à redução das taxas de formação de ATP e à consequente superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO's) potencialmente lesivas (8, 10). Aproximadamente 95% do oxigênio que é consumido nas células seguem pela cadeia transportadora de elétrons, formando energia e água. Os outros 5% serão transformados em ERO's (radical superóxido O_2^- , peróxido

de hidrogênio H_2O_2 e radical hidroxila $\text{OH}^\cdot$) pelo metabolismo. As ERO's podem ser formadas por reações enzimáticas, como por exemplo, na cascata da hipoxantina, da isquemia e reperfusão ou hipóxia e reoxigenação (Figura 1).

Em episódios hipóxico-isquêmicos, o ATP não utilizado na cadeia transportadora de elétrons, pela ausência de oxigênio, é degradado e há o acúmulo de hipoxantina. A reoxigenação, promovida durante as tentativas de ventilação mecânica durante a ressuscitação após o nascimento, leva à oxidação da hipoxantina pela xantina oxidase e à formação de ERO's. A interação de ERO's com componentes da célula representa o principal mecanismo de toxicidade do oxigênio que causa ruptura de membranas lipoprotéicas, alteração da permeabilidade vascular com lesão de capilares, dano a estrutura do DNA e morte celular (2, 19).

Podem ocorrer também algumas lesões indiretas devido a alterações de homeostase do cálcio intracelular levando a um aumento do cálcio citossólico e ativação de mais xantina oxidase. A produção de ERO's é acentuada ainda mais através das reações de Haber-Weiss e de Fenton (2).



Rodrigues, 1998 (Adaptado)

Figura 1. Cascata da hipoxantina para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no processo hipóxia/reoxigenação. FONTE: Rodrigues F. P. M, 1998 (Adaptado)

Com a alta produção de ERO's decorrente do quadro hipóxico-isquêmico o neonato pode ser submetido a um estresse oxidativo associado com a inativação de um grande número de enzimas, dentre as quais podemos citar as enzimas respiratórias mitocondriais (8). De modo especial, os indivíduos recém-nascidos estão mais

susceptíveis ao estresse oxidativo causado por quadros hipóxico-isquêmicos. Frank & Groseclose (1984) em estudos com pulmões de coelhos demonstraram que há um aumento gradativo da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase de acordo com a idade gestacional (1, 19, 22). Assim, quanto mais precoce ocorrer a hipóxia, mais susceptível será o neonato aos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio.

Para as alterações fisiológicas hemodinâmicas e respiratórias que ocorrerão a partir do nascimento, é essencial a atuação de fatores de crescimento que auxiliarão no desenvolvimento do endotélio pulmonar do neonato e na recuperação de lesões acarretadas por processos hipóxico-isquêmicos. Estes fatores de crescimento irão induzir a proliferação de células endoteliais e inibirão a apoptose (36). Dentre esses fatores podemos citar o óxido nítrico (NO) (23), a prostaciclina e as angiostensinas como o VEGF (10).

O VEGF (vascular endothelial growth fator) é um peptídeo homodimérico (34 a 43 kDa) produzido em diferentes células pulmonares, que atua no desenvolvimento pulmonar e na produção de surfactantes, induzindo a conversão de glicogênio em surfactante nos pneumócitos tipo II (24, 25, 36).

No desenvolvimento pulmonar dos mamíferos, após o nascimento, é relatada a presença de transcritos de VEGF devido ao rápido crescimento alveolar e pela expansão das áreas superficiais dos alvéolos e dos capilares. Sua expressão é regulada por fatores como a hipóxia, diferenciação celular e fatores de crescimento (35, 36). Embora saibamos que para o desenvolvimento pulmonar pós-natal seja necessária a proliferação de células endoteliais alveolares, o seu mecanismo regulador não é completamente esclarecido (24).

Em adultos, o RNAm do VEGF continua relativamente abundante em tecidos altamente vascularizados como os pulmões e os rins e possuem sua expressão aumentada durante a cicatrização de lesões, atuando como um fator de manutenção celular. Estudos sugerem que o VEGF tem atuação importante em muitas doenças pulmonares agudas e crônicas, como a hipertensão pulmonar, enfisema, câncer de pulmão; e ainda que, sob condições de hipóxia, a expressão do gene *hypoxia-inducible fator* (HIF-2 α) codificador do VEGF esta aumentada (24, 25, 35, 36).

Dentre os vários efeitos do VEGF nas células epiteliais e vasculares, a sua expressão temporal-espacial tem sido atribuída não apenas à formação dos capilares, mas também para o controle do crescimento brônquico e alveolar (25).

O VEGF é o principal regulador da angiogênese induzindo a mitose e a migração das células endoteliais vasculares e atuando na manutenção da integridade endotelial, como um fator de sobrevivência para os vasos recém-formados, tendo uma importante atuação como um fator de permeabilidade vascular, facilitando a entrada de proteínas do plasma sanguíneo em poucos minutos de exposição (23, 26, 35, 36,).

O VEGF atua ligando-se a dois receptores tirosino-quinase, o VEGFR1 e o VEGFR2 que são responsáveis pela sinalização de diferentes efeitos intracelulares. O VEGFR2 é expresso nos estágios iniciais do desenvolvimento pulmonar enquanto a expressão de VEGFR1 aumentará em estágios posteriores do desenvolvimento (25,28).

O VEGFR2 é o responsável pelo crescimento vascular, atuando na proliferação das células vasculares, promovendo a ramificação vascular e a manutenção das células endoteliais (25, 27, 28).

O VEGFR1, por sua vez, atua como um regulador negativo da angiogênese, reduzindo a proliferação celular e organizando a ramificação dos capilares e a formação das redes. A atuação do VEGFR1 decorre de sua alta afinidade por VEGF promovendo o sequestro deste e reduzindo a disponibilidade de VEGF para ligação ao VEGFR2 (25, 27, 28, 35, 36).

Apesar dos resultados clínicos da asfixia neonatal serem bem estabelecidos, pesquisas pré-clínicas ainda estão em fase exploratória devido principalmente à falta de consenso em um modelo experimental que seja confiável e previsível (8). Foram encontrados na literatura estudos de asfixia neonatal em diversos modelos de animais, como porcos, ovelhas, coelhos e ratos (11, 18, 24, 34).

Apesar da diversidade de modelos experimentais, não existe uma completa reprodutibilidade devido à ampla variedade de diferentes parâmetros (18). Diversos modelos de estudo foram desenvolvidos com diferentes parâmetros e diferentes variáveis e foram alterados e aprimorados ao longo do tempo (29-31).

Takada *et al.* (2011) desenvolveram um modelo não-invasivo de indução de anóxia (privação total de oxigênio) em neonatos de ratos, padronizando alguns parâmetros referentes à duração da anóxia e monitorando o comportamento motor e respiratório, além da saturação de oxigênio arterial (18).

Um dos pontos principais a serem considerados na padronização e no estabelecimento de um modelo experimental é conhecer a correlação entre o período de desenvolvimento e seus mecanismos além da semelhança com as condições humanas. Analisando comparativamente o aspecto temporal do desenvolvimento de ratos e

humanos, Andreollo *et. al.* concluíram que 13,8 dias da vida de um rato equivale a 1 ano da vida de um ser humano e, dessa forma, 1 hora da vida de um rato equivale a 18 horas da vida de um ser humano (32). Outras vantagens para o uso de ratos como modelo experimental são o curto período gestacional (21 dias) com maior número de fetos, o baixo custo de materiais, que não são invasivos e são facilmente reproduzíveis (18). Portanto, utilizar o rato como modelo de asfixia é confiável no que se refere à morfologia, metabolismo e desenvolvimento (33).

Estudos também demonstraram que as principais alterações metabólicas e fisiológicas que ocorrem em neonatos humanos, quando sob condições de privação de oxigênio, foram relatadas em ratos (18). Uma das maiores desvantagens de um modelo hipóxico-isquêmico, entretanto, é o fato de não possibilitar testes comportamentais e o tamanho pequeno para a manipulação.

A elucidação de parâmetros envolvidos na asfixia neonatal e a busca por métodos de tratamento mais eficazes e menos invasivos são fatores de relevância mundial, dada à epidemiologia e o alto grau de mortalidade e morbidade da doença. A importância da expressão dos receptores tirosino-quinase VEGFR1 e VEGFR2 na vasculogênese, na organização vascular e na recuperação de injúrias pulmonares em sendo procurada ao longo do tempo.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a expressão pulmonar dos receptores VEGFR1 e VEGFR2 em ratos neonatos submetidos a modelo de asfixia neonatal e ventilação mecânica.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- A) Verificar as alterações de Peso Corporal (PC) e Peso Pulmonar Total (PPT) de ratos neonatos submetidos a modelo de asfixia neonatal e ventilação mecânica.
- B) Verificar as alterações histométrica vasculares por meio da espessura da camada média das arteríolas pré-acinares no pulmão de ratos neonatos submetidos a modelo de asfixia neonatal e ventilação mecânica.
- C) Avaliar a expressão pulmonar dos receptores tirosino-quinase VEGFR1 e VEGFR2 em ratos neonatos submetidos a modelo de asfixia neonatal e ventilação mecânica.

MATERIAL E MÉTODO

3. Material e Método

3.1. Avaliação do comitê de ética em experimentação animal

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como projeto de pesquisa número 043/2011.

3.2. Animais e obtenção de fêmeas prenhes

Ratos machos e fêmeas *Sprague-Dawley* adultos adquiridos junto ao CEMIB - UNICAMP, foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro), temperatura (média de 23°C), umidade relativa próxima de 55% e receberam água e ração para roedores à vontade. Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa de macho. No dia seguinte foi feito esfregaço vaginal e a presença de espermatozoides na lâmina configurou o dia zero de prenhez (tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias).

3.3. Composição dos grupos amostrais

Foram utilizados para o estudo 32 recém-nascidos que foram divididos em quatro grupos no total cada um contendo oito fetos. A seguir a descrição dos quatro grupos:

- Grupo Controle (C) – mãe e feto controle não sofreram qualquer tipo de manipulação.
- Grupo Controle Ventilado (CV) – feto controle foi submetido à ventilação.
- Grupo Asfixia (A) – feto foi submetido à asfixia.
- Grupo Asfixia Ventilado (AV) – feto foi submetido à asfixia e a seguir à ventilação.

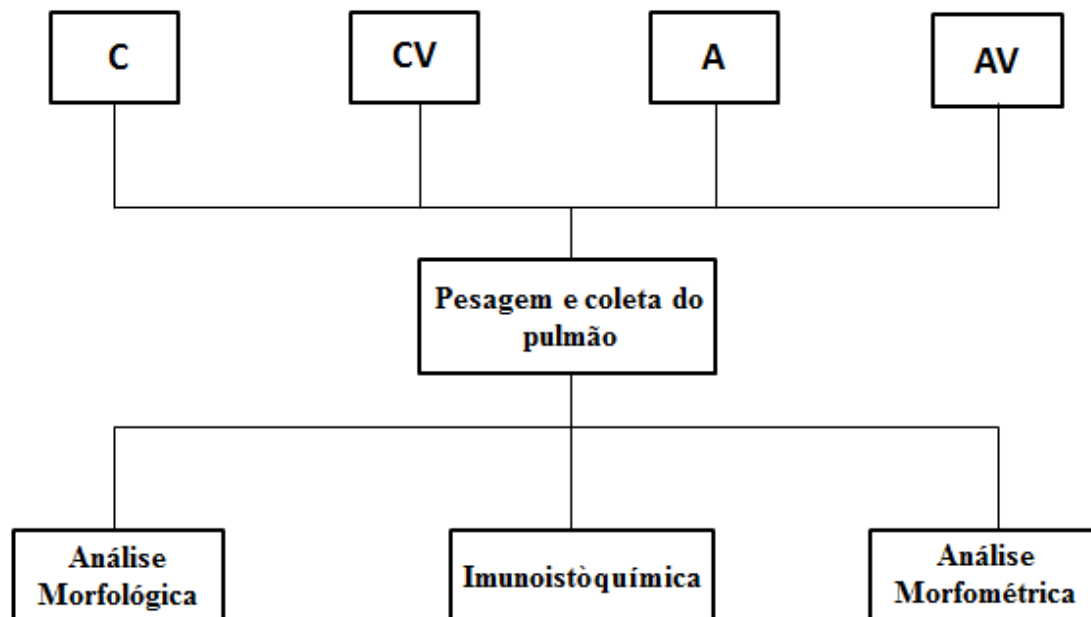


Figura 2. Esquema de estudo do projeto. **C:** Controle; **CV:** Controle Ventilado; **A:** Asfixia; **AV:** Asfixia ventilado.

3.4. Coleta de amostras

No dia 21,5 de gestação, as ratas foram anestesiadas com injeção intramuscular de ketamina base – 50 mg/mL (Ketamina® - Pfizer do Brasil) associada a xilazina 10 mg/mL (Rompum® - Bayer Brasil) por animal, e submetidas a operação cesariana, por laparotomia mediana (Figura 3). Depois da retirada dos fetos do útero, estes foram pesados em balança de precisão modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) e foram obtidos os pesos corporais (PC) em mg. Após a pesagem, os fetos foram encaminhados para realização dos procedimentos específicos de cada grupo.

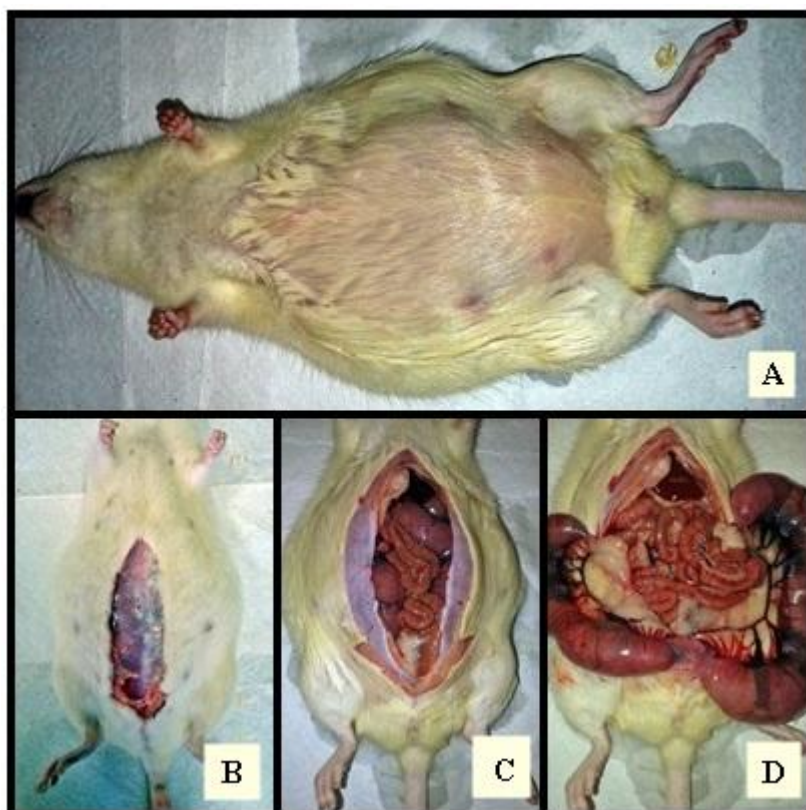


Figura 3. A: Rata posicionada em decúbito dorsal sob cama térmica à 37°C. B, C: Lapartomia mediana. D: Exposição dos cornos uterinos com fetos.

3.5. Indução da asfixia

Seguindo o modelo de Takada *et al.* para indução da asfixia, utilizamos uma câmara anóxica de acrílico com tampa, de dimensões 30cm x 20cm x 12,5cm, a qual teve sua temperatura controlada a 38°C em banho-maria. A câmara foi preenchida durante 10 segundos com fluxo de Nitrogênio (N_2) a 35 L/min (18) (Figura 4). Em seguida, o fluxo de N_2 na câmara foi reduzido para 5 L/min, onde os fetos dos grupos A e AV, já pesados, permaneceram em duplas por um período de 10 minutos. Após asfixia os fetos do grupo A foram sacrificados por decapitação e em seguida colocados em mesa de cortiça para coleta, enquanto os do grupo AV foram encaminhados para ventilação.

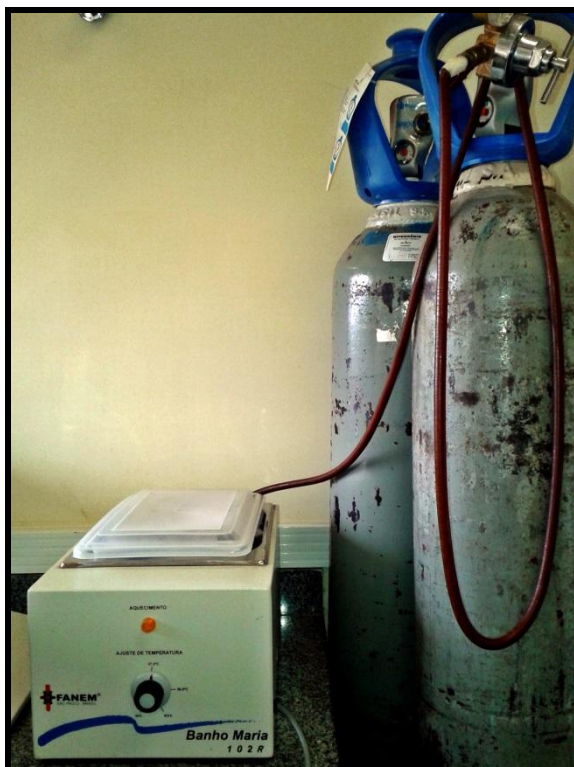


Figura 4. Câmara anóxica de acrílico com tampa e fluxo de N₂ a 35L/min.

3.6. Ventilação pulmonar

A ventilação pulmonar foi realizada nos fetos dos grupos CV e AV que após procedimentos específicos para cada grupo, foram posicionados em decúbito dorsal sobre mesa aquecida (em média 38°C) e fixados com fita adesiva. Com auxílio de microscópio cirúrgico com aumento de 12,5x (D.F.Vasconcellos, SP, Brazil), sofreram então incisão cervical anterior, isolamento da traqueia e secção desta para realização de intubação traqueal com cateter intravascular de teflon 24G (BD) 0.17 x 19 mm (Figura 5) que foi conectado a um respirador ciclado à volume (MiniVent type 845, Harvard Apparatus®, Alemanha), a um volume de 75μL e frequência de 80 incursões por minuto (ipm) (Figura 6). Após a confirmação de que o movimento dos pulmões do rato recém-nascido foi satisfatório, a ventilação teve duração de 30 minutos. A oxigenação dos animais foi confirmada pelo movimento dos pulmões e cor da pele. Em seguida os fetos de ambos os grupos foram sacrificados por decaptação e colocados em mesa de cortiça para coleta.

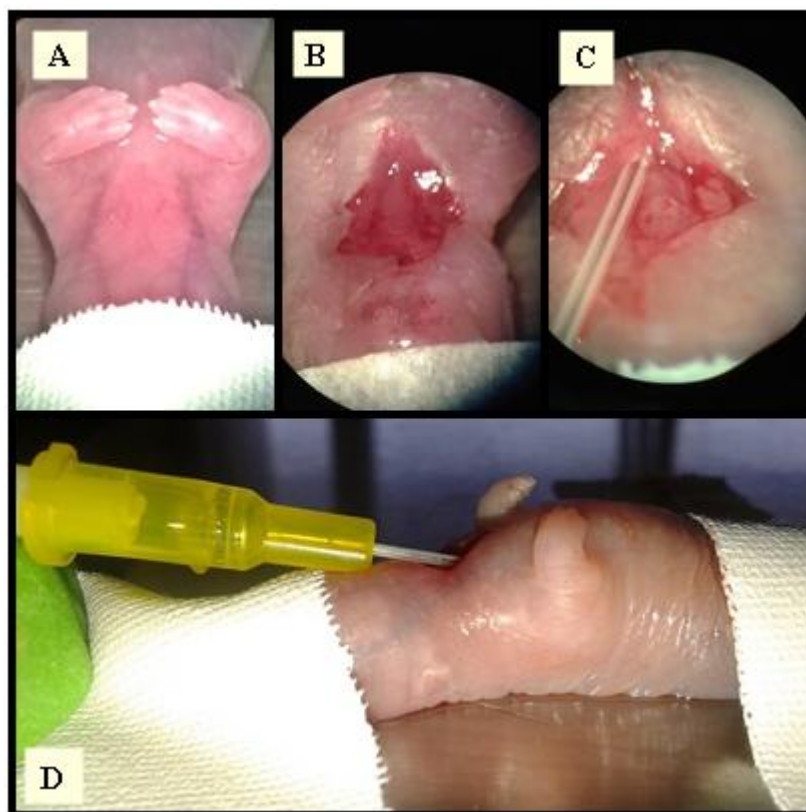


Figura 5. A) Feto posicionado em decúbito dorsal sobre mesa aquecida (em média 38°C) e fixados com fita adesiva. B) Realização de incisão cervical anterior. C) Feto entubado com cateter de teflon e ventilado. D) Visão lateral do recém nascido sendo ventilado.

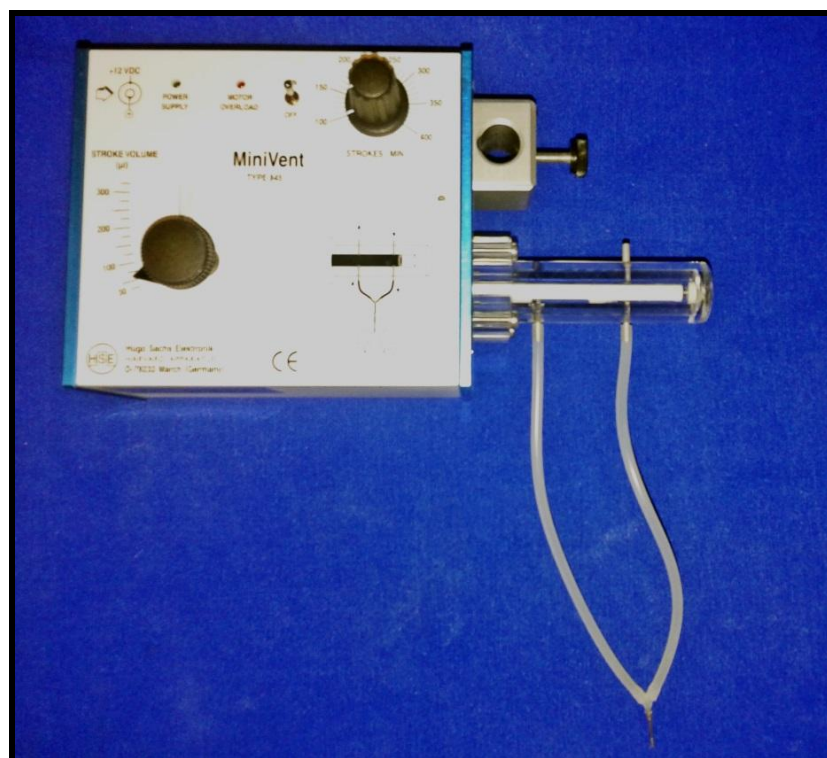


Figura 6. Respirador ciclado à volume (MiniVent type 845, Harvard Apparatus®, Alemanha), a um volume de 75μL e frequência de 80 incursões por minuto (ipm).

3.7. Avaliação biométrica dos fetos e órgãos

Os fetos de todos os grupos tiveram o abdome e o tórax aberto e os pulmões foram removidos e pesados. Foram aferidas as seguintes variáveis: peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT) e em seguida a relação PPT/PC foi calculada para excluir a influência do PC sobre o PPT.

3.8. Processamento histológico para análise morfométrica e imunoistoquímica

Os pulmões foram fixados em solução de formaldeído 10%. Após fixação, as amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol 70%, 80%, 90% e 100% respectivamente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo Leica – Modelo RM 2145 (Leica, Salzburg, Austria), no sentido transversal, com espessura de 5 µm e colocados em lâminas histológicas pré-silanizadas para melhor aderência. Para análise morfométrica os cortes foram corados por Tricômio de Masson e as lâminas serão montadas em Permount® (Fisher Scientific, Pittisburgh, PA, USA). A técnica consiste na coloração com Hematoxilina de Harris, Fucsina Ácida de Ponceau 0,5%, Ácido Fosfomolibdico 1% como diferenciador e Azul de Anilina. Este tipo de coloração permite visualizar as fibras colágenas em azul, o citoplasma em rosa e o núcleo em roxo.

3.9. Análise da morfometria vascular

Com as lâminas prontas, os cortes foram fotografados utilizando o fotomicroscópio NIKON Eclipse 80i com aumento de 200x e as imagens foram tratadas pelo programa Image Pro Plus 6.0, no qual as camadas médias das arteríolas pré-acinares de resistência entre 30-60 µm foram medidas. Os parâmetros morfométricos vasculares analisados foram: diâmetro externo (DE, µm), e diâmetro interno (DI, µm), a partir dos quais foi calculada a espessura proporcional da camada muscular média (ECM), obtida por meio do cálculo: $ECM = (DE-DI)/DE$. (Figura 7).

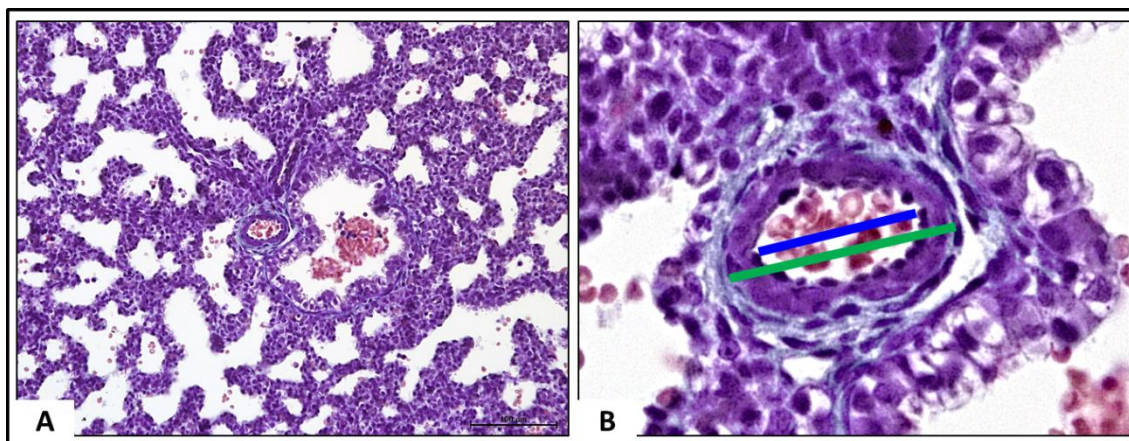


Figura 7. A) Modelo de fotografia de campo pulmonar em aumento de 200x. **B)** Exemplo de medição do diâmetro externo (DE) (linha verde) e diâmetro interno (DI) (linha azul).

3.10. Imunoistoquímica para VEGFR2 e VEGFR1

Para análise por imunoistoquímica, as lâminas foram mantidas em estufa (60°C) por 30 minutos para derretimento da parafina. A seguir, as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água destilada (Figura 8A); posteriormente, as lâminas passaram pelo processo de Recuperação Antigênica através de fervura em panela elétrica (Walita – Jamie Oliver, *Philips*) (Figura 8B) com Tampão Citrato 10mM, pH 6.0 por 40 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em PBS. Posteriormente, foi feito o bloqueio com soro de cabra 10% em PBS, por 1 hora em câmara escura úmida (Figura 8C). A seguir, os cortes foram incubados “overnight” à temperatura de 4°C durante 12 horas com os anticorpos primários já diluídos 1:50 em BSA (1,8%) (VEGFR1: rabbit, ab2350, Abcam, Cambridge, MA, USA; VEGFR2: mouse, sc6251, Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Retirado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (VEGFR1: anticorpo biotinilado de cabra anti-rabbit – sc-2040, Santa Cruz Biotechnology, California, USA; VEGFR2: anticorpo biotinilado de cabra anti-mouse – sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, California USA) diluídos 1:200 em BSA. Após esta etapa, os cortes foram incubados por 30 minutos em Streptavidina – HRP (Biolegend #405210) diluído 1:200 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3'-diaminobenzidino-tetra-hidrocloreto; *Sigma*, St Louis, MO, USA) diluído 1:100 em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por 20 minutos. Por fim, as lâminas foram submetidas à contracoloração com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, desidratadas por

uma sequência de banhos de concentrações crescentes de alcoóis e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount® (Fisher Scientific, Pittisburgh, PA, USA).

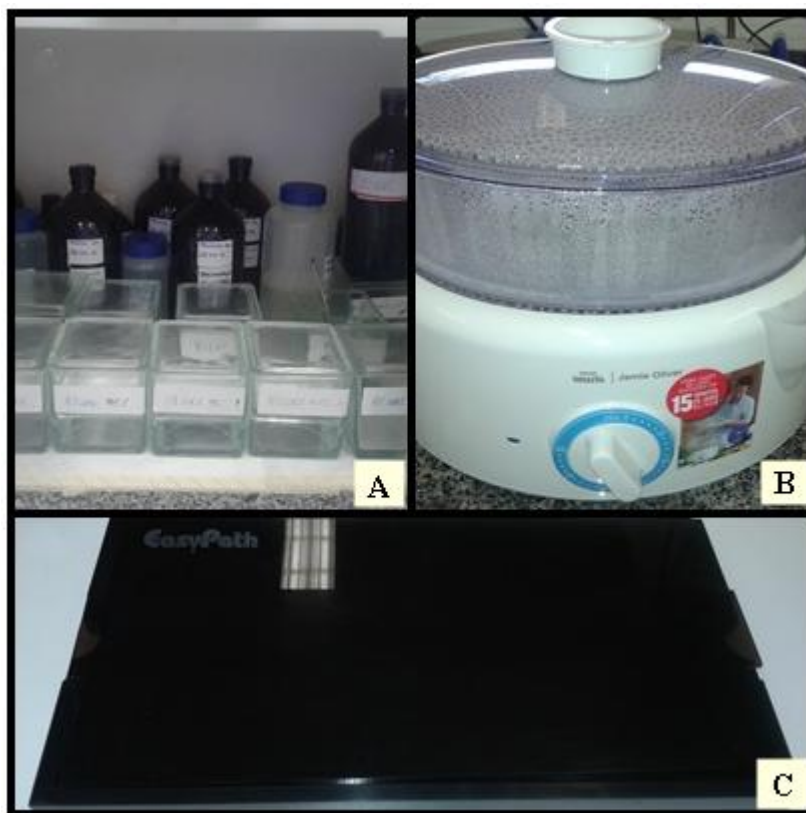


Figura 8. A: Banhos de xilol e álcoois em níveis decrescentes de concentração. B: Panela elétrica à vapor para recuperação antigênica. C: Câmara escura úmida.

3.11. Análise semiquantitativa da imunoistoquímica

A análise da imunoistoquímica foi realizada por avaliação da intensidade da marcação por escore com variação de 0 a 3, sendo a menor nota atribuída quando não houve expressão da enzima na amostra com aumento gradativo de 0,5 ponto para níveis crescentes de expressão. AS lâminas foram analisadas por 3 avaliadores cegos e independentes. O controle negativo foi realizado no estudo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

4. Análise estatística

Os valores obtidos através de pesagem, morfometria e imunoistoquímica foram avaliados pelo método de ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer considerando as diferenças significativas para $p < 0.05$. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Os cálculos foram feitos por meio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

5. Resultados

Foram analisados 32 recém-nascidos de ratos da raça *Sprague-Dawley* oriundos de 8 ratas prenhes. Foram destinados 8 filhotes por grupo para a análise biométrica, 4 filhotes por grupo para a análise histológica e 4 filhotes por grupo para a análise imunoistoquímica.

5.1 Análise Biométrica

As médias do Peso Corporal (PC), do Peso Pulmonar Total (PPT) e da relação PPT/PC com seus respectivos desvios-padrão são apresentados na tabela 1. Observa-se que os filhotes asfixiados ventilados apresentaram uma média de PPT significativamente menor comparado aos grupos: C e A ($p<0,005$ e $p<0,05$, respectivamente) (Figura 9). Ao analisarmos a relação PTT/PC também foi possível observar diferenças significativas entre o grupo AV e os grupos C e A ($p<0,05$). O grupo que apresenta a maior relação PPT/PC é o grupo C é o que apresenta a maior relação, enquanto o grupo AV, apresenta a menor.

Tabela 1. Média e desvio-padrão do peso corporal (PC), do peso pulmonar total (PPT), da relação PPT/PC (n=8 por grupo).

	PC (n=8)	PPT (n=8)	PPT/PC (n=8)
C	5,5290 ($\pm 0,5276$)	0,1727 ($\pm 0,0234$)** ^a	0,0314 ($\pm 0,0043$)** ^a
CV	5,4636 ($\pm 0,3189$)	0,1491 ($\pm 0,0249$)	0,0274 ($\pm 0,0052$)
A	5,6196 ($\pm 0,2123$)	0,1565 ($\pm 0,0222$)* ^a	0,0279 ($\pm 0,0044$)* ^a
AV	5,5263 ($\pm 0,5053$)	0,1214 ($\pm 0,0193$)	0,0220 ($\pm 0,0029$)

^a: Comparado com grupo AV. * $p<0,05$, ** $p<0,005$.

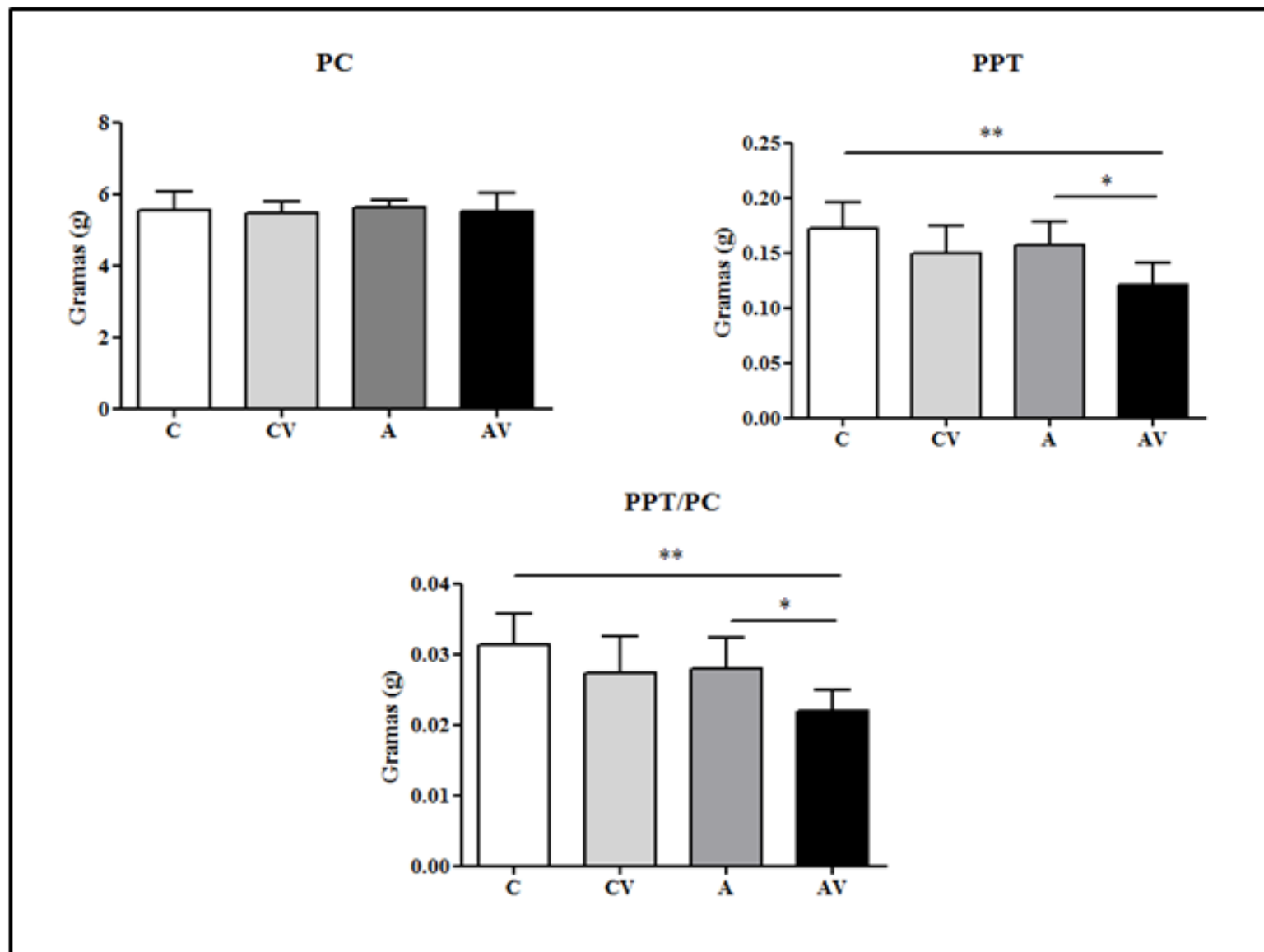


Figura 9. Gráficos do PC (Peso Corporal), PPT (Peso Pulmonar Total), PPT/PC (razão Peso Pulmonar Total/Peso Corporal) dos grupos estudados. C: Controle. CV: Controle Ventilado. A: asfixia. AV: asfixia ventilado.

5.2 Análise da morfometria vascular

A análise da morfometria vascular foi realizada por cálculo da espessura proporcional da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares de resistência entre 30-60 μm . Foram analisados 30 vasos por grupo provenientes de 4 fetos em campos aleatórios. As médias e os respectivos desvios-padrão dos valores de ECM obtidos para cada um dos grupos estudados estão apresentados na Tabela 2. Os filhotes asfixiados apresentaram uma média de ECM significativamente maior comparado aos demais grupos: C, CV e A ($p < 0,05$) (Gráfico 1). Observou-se também um significativo aumento de ECM do grupo CV em relação ao grupo C ($p < 0,05$) e uma significativa redução do grupo AV comparado ao grupo A ($p < 0,005$).

Tabela 2. Média e desvio-padrão da espessura da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares de resistência.

	ECM
C	0,40667 ($\pm 0,09325$)* ^a * ^b
CV	0,48125 ($\pm 0,10037$)* ^{bd}
A	0,55433 ($\pm 0,13841$)* ^a * ^c * ^d
AV	0,45113 ($\pm 0,11366$)* ^b

^a: Comparado ao CV, ^b: Comparado ao A, ^c: Comparado ao AV, ^d: Comparado ao C. ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

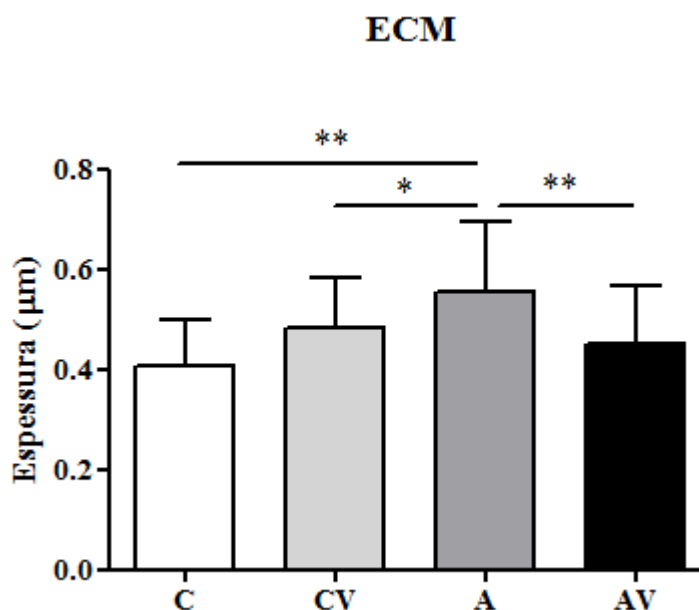


Gráfico 1. Espessura da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares de resistência. **C**: Controle. **CV**: Controle ventilado. **A**: Asfixiado. **AV**: Asfixiado ventilado. Observar maior espessura da camada média (ECM) no grupo A comparado aos demais grupos. ** $p < 0,005$. * $p < 0,05$.

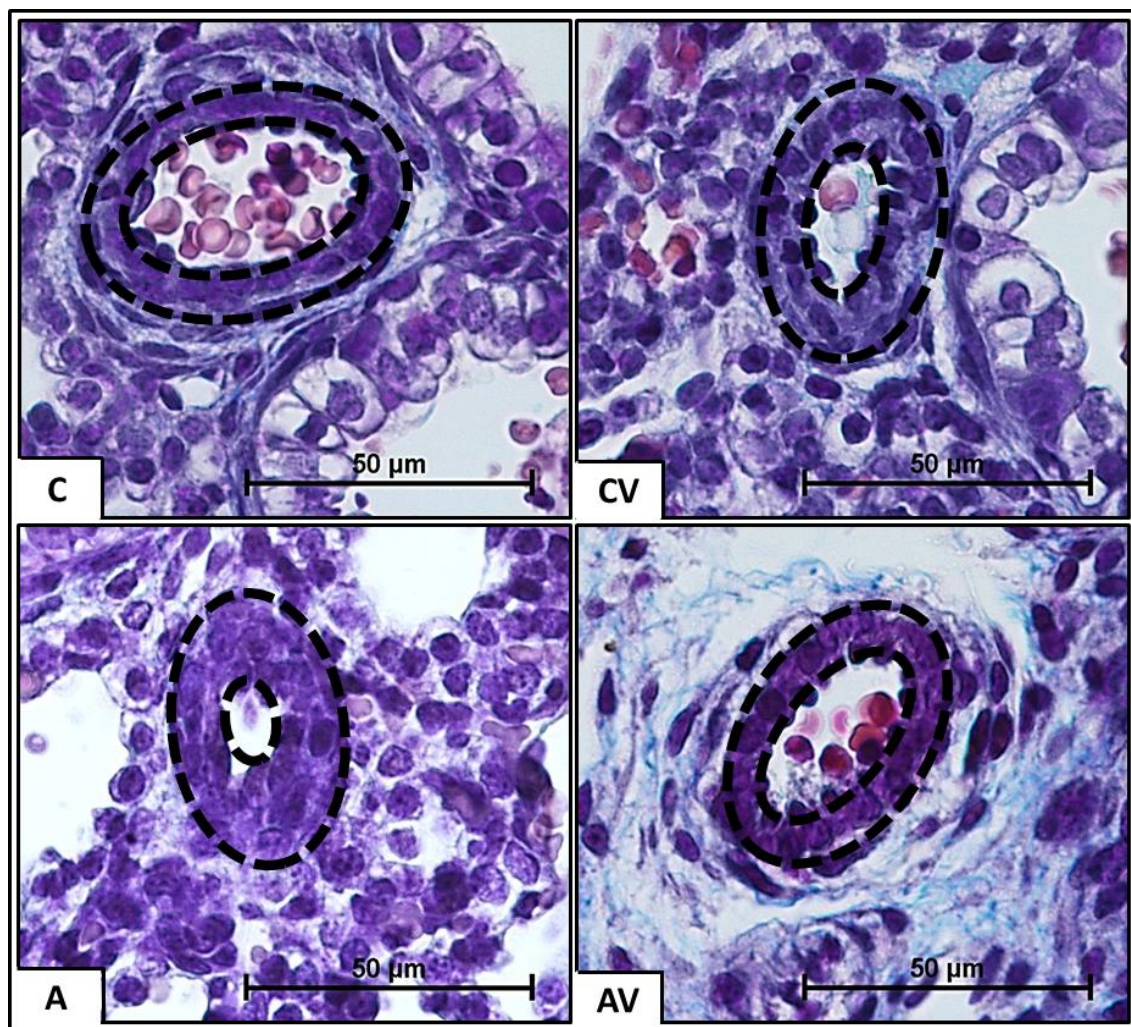


Figura 10. Arteríolas pré-acinares de resistência coradas por Tricrômio de Masson. Linhas tracejadas destacam a camada média arteriolar (ECM). Notar maior ECM no grupo A. C: Controle. CV: Controle Ventilado. A: Asfixia. AV: Asfixia Ventilado (Barra de escala = 50µm). Aumento de 400X.

5.3 Imunoistoquímica para VEGFR2 e VEGFR1

Para a análise da expressão de VEGFR2 e VEGFR1, 3 avaliadores atribuíram um score, com variação de 0 a 3, sendo a menor nota atribuída quando não houve expressão da enzima na amostra com aumento gradativo de 0,5 ponto para níveis crescentes de expressão. Ao fim, foi feita uma comparação entre as 3 diferentes análises e suas respectivas médias e desvios-padrão são apresentadas na Tabela 3. A expressão de VEGFR2 no pulmão de asfixiados foi aumentada em comparação aos demais grupos: C, CV e AV ($p < 0,05$) (Gráfico 2). Observou-se também que o grupo controle (C) apresentou os menores níveis de expressão de VEGFR2, em comparação aos demais grupos: CV, A e AV ($p < 0,05$). Em relação ao VEGFR1, observamos que o grupo asfisiado (A) exibiu expressão significativamente menor comparado aos grupos CV e

AV ($p<0,05$) e significativamente maior comparado ao grupo C ($p<0,05$). Pudemos observar também que o grupo controle (C) foi o que apresentou a menor expressão de VEGFR1, comparado demais grupos: CV, A e AV ($p<0,05$). O controle negativo foi realizado e não apresentou marcação, como era esperado.

Tabela 3. Média e desvio-padrão do score de imunomarcção de VEGFR2 e VEGFR1 através de análise imunoistoquímica.

	VEGFR2	VEGFR1
C	1,3939 ($\pm 0,2075$)** ^{abc}	1,9848 ($\pm 0,1970$)* ^{b**ac}
CV	1,8676 ($\pm 0,4139$)** ^{bd}	2,3888 ($\pm 0,2423$)* ^{b***d}
A	2,1944 ($\pm 0,5641$)* ^{c***ad}	2,1730 ($\pm 0,2425$)* ^{da***c}
AV	1,8823 ($\pm 0,3904$)* ^{b***d}	2,4242 ($\pm 0,3775$)* ^{**bd}

^a: Comparado ao CV, ^b: Comparado ao A, ^c: Comparado ao AV, ^d: Comparado ao C. ** $p<0,005$; * $p<0,05$.

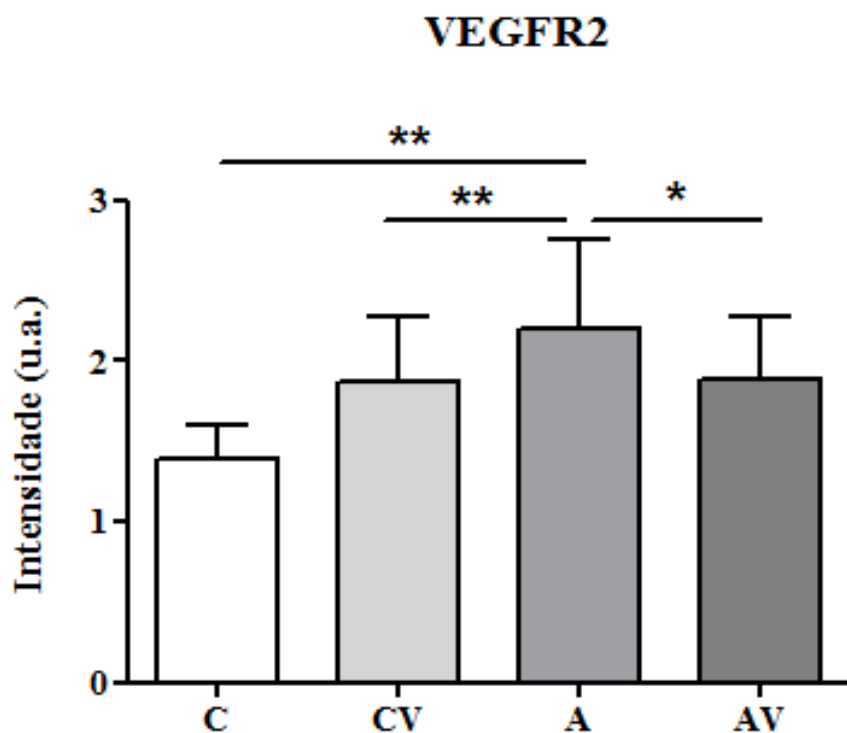


Gráfico 2. Análise da expressão de VEGFR2 no pulmão por imunoistoquímica. **C:** Controle. **CV:** Controle ventilado. **A:** Asfixiado. **AV:** Asfixiado ventilado. Observar maior expressão de VEGFR2 no grupo A comparado aos demais grupos. ** $p<0,005$. * $p<0,05$.

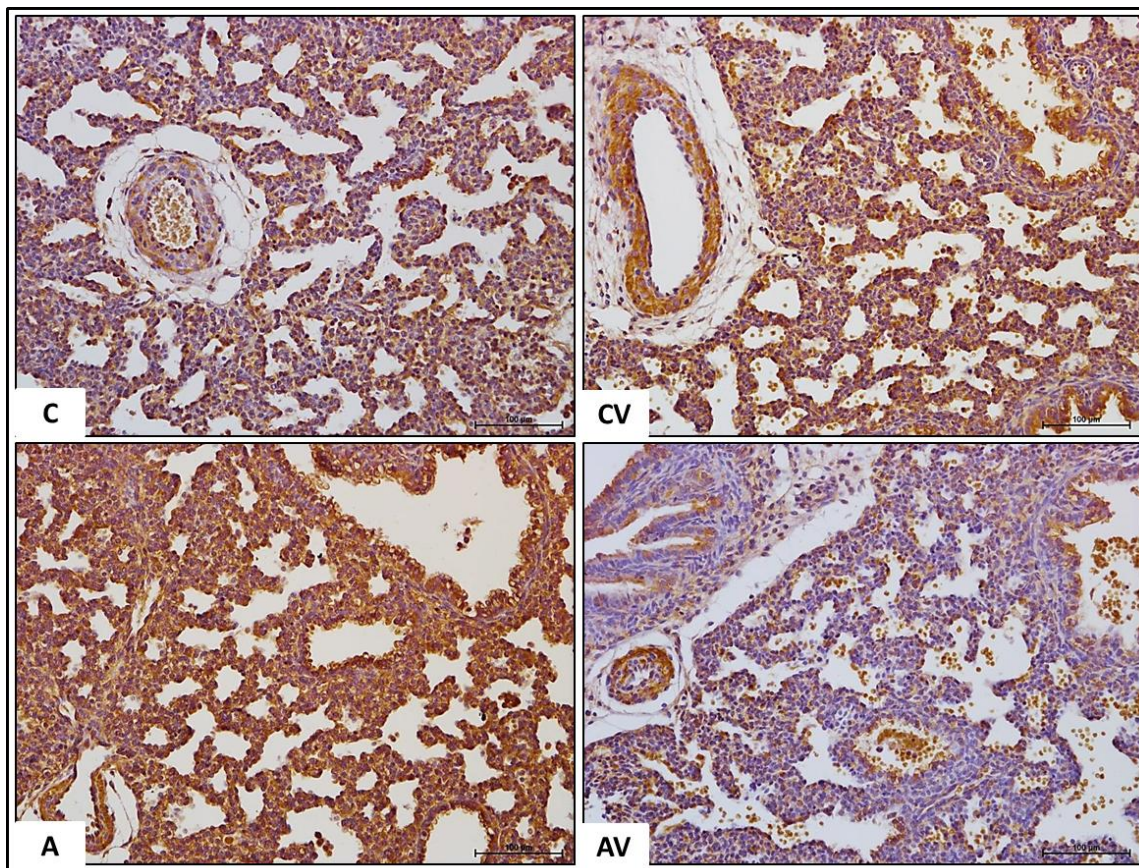


Figura 11. Imunoistoquímica para VEGFR2 dos grupos estudados. **C:** Controle. **CV:** Controle Ventilado. **A:** Asfixia. **AV:** Asfixia Ventilado. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

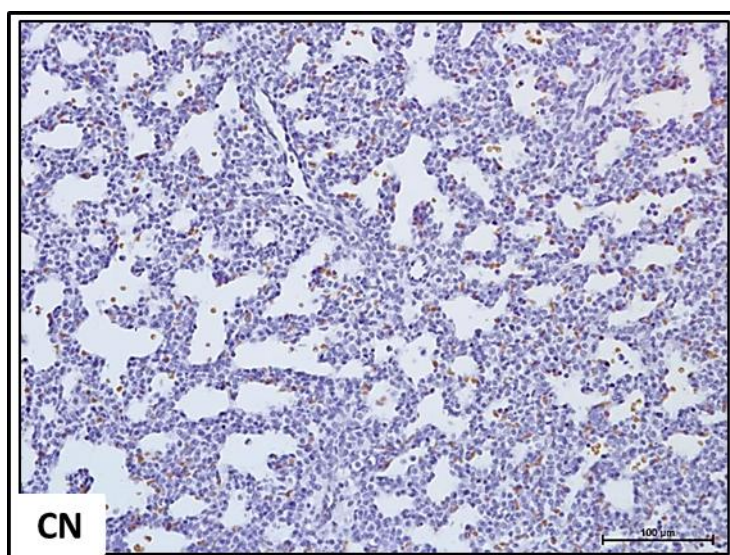


Figura 12. Controle negativo da Imunoistoquímica para VEGFR2. **CN:** Controle Negativo. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

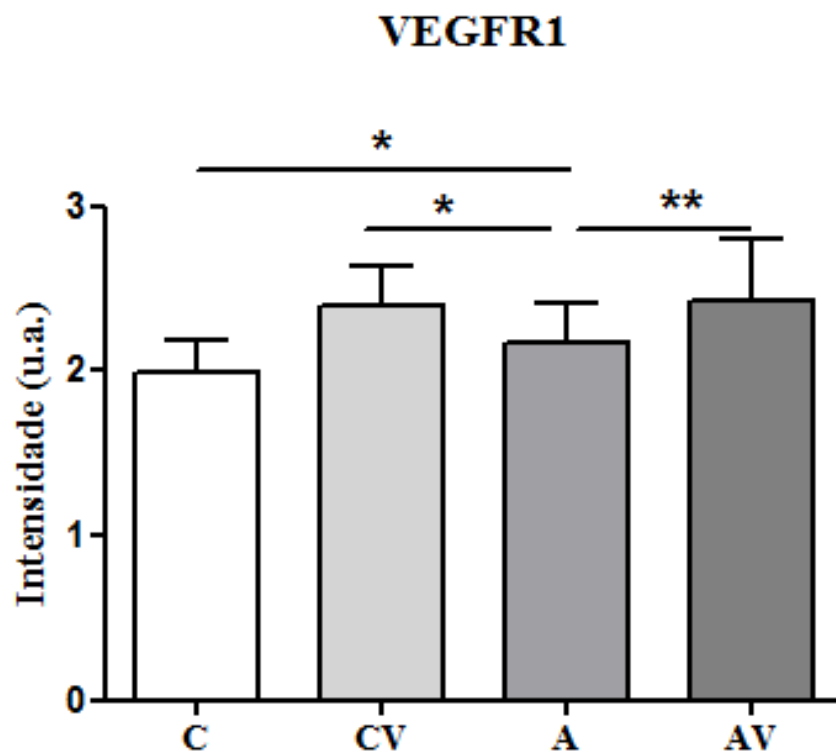


Gráfico 3. Análise da expressão de VEGFR1 no pulmão por imunoistoquímica. **C:** Controle. **CV:** Controle ventilado. **A:** Asfixiado. **AV:** Asfixiado ventilado. Observar menor expressão de VEGFR1 no grupo C comparado aos demais grupos e a menor expressão em A comparado aos grupos CV e AV. ** $p < 0,005$. * $p < 0,05$.

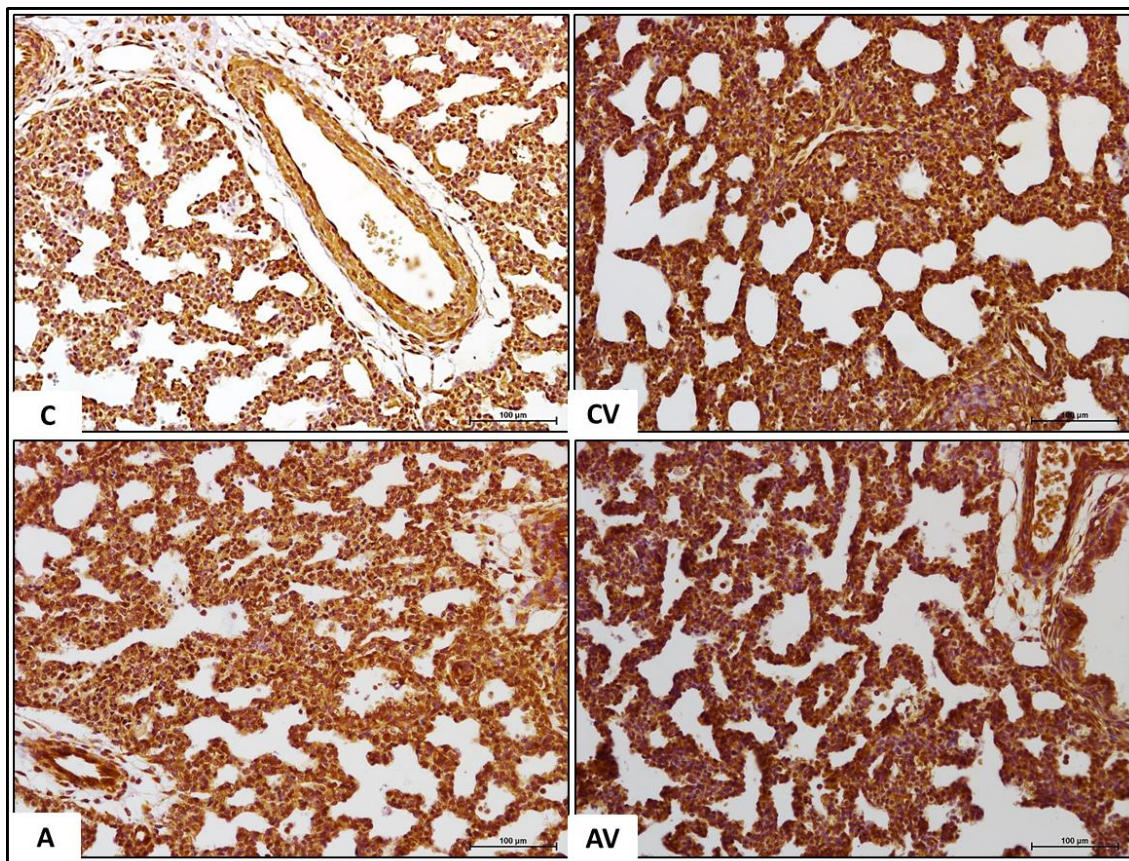


Figura 13. Imunoistoquímica para VEGFR1 dos grupos estudados. C: Controle. CV: Controle Ventilado. A: Asfixia. AV: Asfixia Ventilado. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

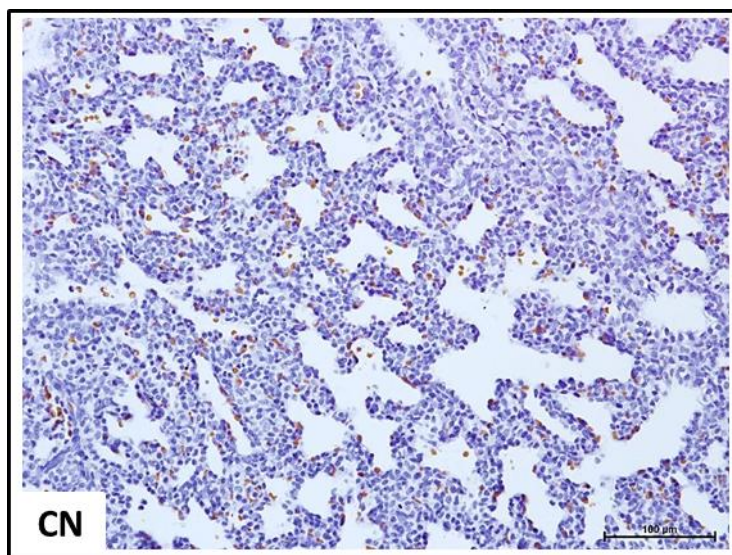


Figura 14. Controle negativo da Imunoistoquímica para VEGFR1. CN: Controle Negativo. (Barra de escala = 100µm). Aumento de 200X.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Os eventos hipóxico-isquêmicos ao qual o recém-nascido está sujeito por complicações nos períodos que antecedem ou sucedem o nascimento levam a um acometimento severo pela AN (1-8). A AN é responsável por um elevado grau de morbidade e mortalidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a AN perfaça mais de 20% da taxa mundial de mortalidade neonatal representando mais de 1 milhão de mortes por ano (14). Os recém-nascidos, quando não vão a óbito em decorrência da doença podem apresentar graves complicações pulmonares como hipertensão e hemorragia, bem como distúrbios neurológicos, tais como: retardo mental, dificuldades de aprendizado, paralisia cerebral e disfunções visuais e auditivas (1, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 18).

Segundo a OMS a AN é responsável pelo acometimento de quase 10 milhões de recém-nascidos, todos os anos, no mundo todo. Esta taxa elevada pode se acentuar ainda mais em países em desenvolvimento onde há a prevalência de fatores de risco como a falta de cuidados pré-natais adequados (6, 8, 9, 15, 16). Outros fatores aos quais a asfixia neonatal é atribuída é o tabagismo, a prematuridade, ou doenças maternas como a diabete (10, 12).

Dentre as formas de tratamento para a asfixia neonatal, a ventilação mecânica é o mais comumente utilizado, para ressuscitação e reoxigenação do recém-nascido, e também como indutor de alcalose metabólica (8).

A despeito disto, a ventilação pode ser danosa ao organismo no que diz respeito à manutenção da homeostase, por manter vias metabólicas alternativas que podem acarretar em déficit energético e estresse oxidativo (8, 10, 21). Dada a gravidade de uma reoxigenação mal calculada, se faz de extrema relevância a padronização de volumes funcionais adequados e seguros a serem ministrados por ventilação mecânica, de modo a não acentuar as lesões pulmonares (19, 20).

Em nosso estudo, o PC dos grupos estudados não apresentou diferença significativa, uma vez que os neonatos foram pesados anteriormente a qualquer procedimento, como asfixia ou ventilação. No que se refere ao PPT, observou-se que o grupo AV apresentou os menores valores comparado aos grupos C e A ($p<0,05$), sugerindo a existência de uma relação direta do peso pulmonar com o procedimento ventilatório após asfixia. Esta observação vai de encontro ao que fora relatado em trabalhos anteriores do laboratório, nos quais foram verificadas sensíveis reduções no

PPT de recém-nascidos ventilados em comparação a grupos não ventilados. Da mesma maneira, a razão PTT/PC apresentou diminuição significativa no grupo AV comparado aos grupos C e A ($p < 0,05$). Isto pode estar associado ao fato de que a ventilação promove a expulsão do líquido pulmonar, presente durante o desenvolvimento, levando à aeração pulmonar e reduzindo seu peso e densidade (2).

Já é sabido que a reoxigenação, promovida durante ventilação mecânica do recém-nascido asfíxiado, pode representar alto risco de toxicidade ao organismo (2,19). Os procedimentos ventilatórios são costumeiramente realizados em quadros de asfíxia neonatal, oriundos de episódios hipóxico-isquêmicos que podem ocorrer devido a compressão do cordão umbilical, a ruptura da placenta, a pré-eclâmpsia, dentre outros. (3,5,7). Estes quadros, levam a uma sensível redução do oxigênio e do fluxo sanguíneo para todo corpo, sendo consideradas complicações multissistêmicas.

Pela ausência do oxigênio, o ATP não utilizado na cadeia transportadora de elétrons, segue a via da hipoxantina. Com a reoxigenação pela ventilação mecânica, a hipoxantina será oxidada via xantina oxidase, uma enzima constitutiva que leva à formação de xantina e do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), uma espécie reativa de oxigênio (ERO) altamente tóxica para o organismo por promover morte celular, apoptose e senescência (37). Através das reações de Haber-Weiss e de Fenton (2) na presença de íons metálicos, a produção de ERO's, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), pode ser acentuada (2, 8, 10, 19).

As ERO's possuem uma importante atuação em vias que levam à angiogênese. A angiogênese é definida por Fukai & Nakamura (2008) como o processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Esse processo possui relação direta com o crescimento tumoral, com a metástase, bem como no desenvolvimento embrionário e na cicatrização de lesões. A atuação ocorre no sentido de suprir a alta demanda de fluxo sanguíneo durante estes episódios (37). De acordo com Julian (2007), as lesões decorrentes da atividade de ERO's, durante episódios hipóxico-isquêmicos, são responsáveis por induzir a remodelagem da vasculatura pulmonar. Esta remodelagem se dá através da contração e da hipertrofia da parede muscular das arteríolas pulmonares, que são sensíveis à redução da pressão parcial de oxigênio (40, 41, 42).

No presente trabalho, realizamos a análise da espessura da camada média (ECM) das arteríolas pré-acinares do pulmão, de modo a avaliarmos possíveis efeitos de episódios hipóxico-isquêmicos característicos da asfíxia neonatal e de procedimentos ventilatórios utilizados no tratamento da doença.

Observamos que os neonatos submetidos à asfixia apresentaram um importante aumento na ECM das arteríolas, e também que houve um aumento significativo na espessura do grupo CV em relação ao grupo controle que não foi ventilado (C) ($p < 0,05$), sugerindo um importante efeito da ventilação mecânica na remodelagem da vasculatura pulmonar. Nossas observações corroboram com os estudos de Sands *et al.* (2011) que observaram um aumento de espessura da parede das arteríolas pré-acinares em recém-nascidos asfíxiados (38).

No que se refere à atuação dos processos ventilatórios, Gonçalves *et al.* (2014) também registraram um aumento de espessura da parede das arteríolas pulmonares de grupos controle ventilados, em comparação com grupos não ventilados (23). Podemos atribuir o aumento na espessura das arteríolas ao aumento da resistência vascular e da pressão arterial pulmonar (40). Estas alterações vasculares caracterizam uma síndrome da resposta inflamatória, gerada pelas lesões teciduais oriundas da citotoxicidade de ERO's após episódios de hipóxia (41).

Segundo Gerosa *et al.* (2014), um dos principais fatores transcricionais envolvidos na angiogênese, é o *hypoxia-inducible factor* (HIF-2), que atua no aumento da transcrição de genes em resposta à hipóxia (41). Como consequência da hipersecreção de HIF-2 devido à lesões geradas pela toxicidade das ERO'S, há o aumento da produção de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), um dos mais importantes fatores de crescimento da angiogênese (35, 37, 41).

O VEGF, durante a angiogênese, tem papel fundamental no estímulo da permeabilidade, da proliferação e da migração das células endoteliais, que levarão à formação do tubo endotelial. Os efeitos biológicos do VEGF são regulados por dois receptores tirosino-quinases de superfície celular, o VEGFR1 e o VEGFR2 (37).

Os efeitos mutagênico e quimioestático do VEGF nas células endoteliais têm sido atribuídos à mediação pelo VEGFR2, que é ativado pela auto-fosforilação de resíduos de tirosina. Seguinte à ativação de VEGFR2, se dá a ativação de cascatas de vias sinalizadoras como das proteínas-quinase ativadas por mitógenos, como a Akt e eNOS, que atuam no processo de migração e proliferação de células endoteliais (37-39).

Isso vai de encontro a estudo de Sbragia *et al.* (2014), que demonstraram por silenciamento do gene que codifica VEGFR2 a redução ou supressão da angiogênese, sugerindo a importância deste para o desenvolvimento vascular (25).

No presente trabalho, observamos através de análises imunoistoquímicas que a expressão de VEGFR2 no pulmão de neonatos asfíxiados (A) foi maior em relação aos

demais grupos: C, CV e AV ($p<0,05$) (Gráfico 1). Neste sentido, nossos estudos corroboram com o que fora registrado por Voelkel *et al.* (2006) que observaram um aumento da expressão de VEGFR2 após eventos hipóxico-isquêmicos (35). Este aumento possivelmente está associado à modulação do VEGF, atuante no processo de proliferação e migração de células endoteliais.

Segundo Waltenberger *et al.* (1994), o VEGFR1 apresenta uma afinidade muito maior pelo VEGF quando comparado ao VEGFR2. Entretanto, devido à sua baixa capacidade em atuar como promotor de crescimento e por ser fracamente fosforilado, o VEGFR1 pode representar um fator de silenciamento de VEGF (39). Entende-se, deste modo, que devido à atuação no sequestro de VEGF, o VEGFR1 seja responsável pela regulação negativa da angiogênese, contribuindo para a maturação e organização das redes vasculares (23, 35, 36, 38).

Em nosso trabalho foi possível observar que o grupo A exibiu expressão de VEGFR1 significativamente menor comparado aos grupos CV e AV ($p<0,05$).

Entende-se que durante a asfixia neonatal decorrida de condições de hipóxia, as lesões teciduais provocadas pela toxicidade de ERO's promovem a estimulação da angiogênese, e de seus principais mediadores: VEGF e VEGFR2 (37-39).

Desse modo, podemos inferir que a expressão de VEGFR1, atuante na modulação negativa da angiogênese, seja reduzida em condições de asfixia neonatal, o que é corroborado pelas nossas análises.

Finalmente, podemos concluir que no modelo de asfixia neonatal em ratos a termo, a asfixia seguida de ventilação mecânica altera a morfologia, morfometria vascular e as vias receptoras de VEGF pulmonar, apresentando, principalmente nos neonatos submetidos à asfixia (A), significativo aumento da ECM e alteração na expressão dos receptores tirosino-quinases VEGFR1 e VEGFR2 que, neste modelo, responderam inversamente proporcional aos estímulos hipóxico-isquêmicos.

Apesar de termos algumas limitações em nosso trabalho, como a não avaliação do VEGF e apenas uma avaliação istoquímica, esses resultados experimentais podem somar evidências ao entendimento da modulação vascular pulmonar decorrentes da asfixia neonatal e às terapias ventilatórias frequentemente usadas no cuidado clínico, para isso, torna-se necessário o aprofundamento desses dados em estudos clínicos.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Conclui-se que no modelo de asfixia neonatal em ratos a termo, a asfixia seguida de ventilação mecânica altera a os pesos corporal e pulmonar, a morfometria vascular e as vias receptoras de VEGF pulmonar, apresentando, principalmente nos neonatos submetidos à asfixia (A), significativo aumento da ECM e alteração na expressão dos receptores tirosino-quinases VEGFR1 e VEGFR2 que, neste modelo, responderam inversamente proporcional aos estímulos hipóxico-isquêmicos.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

- 1) Saraceno G. E.; Ayala M. V.; Badorrey M. S.; *et al.* Effects of Perinatal Asphyxia on Rat Striatal Cytoskeleton. *Synapse* 2012; 66:9-19.
- 2) Fellman V.; Raivio K. O. Reperfusion Injury as the Mechanism of Brain Damage after Perinatal Asphyxia. *Pediatric Research* 1997; 41:599-606.
- 3) Giussani D. A. The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms. *J Physiol* 2015; 1-16.
- 4) Strata F.; Stoianov I. P.; Villers-Sidani E.; Bonham B.; Martone T.; *et al.* Perinatal Asphyxia Affects Rat Auditory Processing: Implications for Auditory Perceptual Impairments in Neurodevelopmental Disorders. *PLoS ONE* 2010; 5(12).
- 5) Frizzo J. K.; Cardoso M. P.; de Assis A. M.; *et al.* Effects os Acute Perinatal Asphyxia in the Rat Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30:683-692.
- 6) Ahearne C. E.; Boylan G. B.; Murray D. M. Short and long term prognosis in perinatal asphyxia: An update. *World J Clin Pediatr* 2016; 5(1):67-74.
- 7) Souza S. K.; Martins T. L.; Ferreira G. D.; *et al.* Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral córtex. *Metab Brain Dis* 2012.
- 8) Herrera-Marschitz M.; Morales P.; Leyton L.; *et al.* Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinela proteins. *Neurotox Res* 2011; 19:603-627.
- 9) Takazono P. S.; Golin M. O. Asfixia Perinatal: Repercussões Neurológicas e Detecção Precoce. *Ver Neuroscienc* 2013; 21(1):108-117.
- 10) Lapoint A.; Barrington K. J. Pulmonary Hypertension and the Asphyxiated Newborn. *The Journal of Pediatrics* 2011; 158:e19-24.
- 11) Sobotka K. S.; Ong T.; Polglase G. R.; *et al.* The effect of oxygen content during an initial sustained inflation on heart rate in asphyxiated near-term lambs. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100:F337-F343.
- 12) Zaconeta C. A. M. Asfixia Perinatal. In: Assistência ao Recém-nascido de Risco, 2^a ed. 2004.
- 13) Gane B.; Bath B.V.; *et al.* Risk factors and Outcome in Neonatal Necrotising Enterocolitis. *Indian J Pediatr* 2014; 81:425-428.

- 14) Liu L.; Johnson H. L.; *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an update systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012; 379:2151-2161.
- 15) Reddy N. R.; Krishnamurthy S.; *et al.* Glutamate antagonism fails to reverse mitochondrial dysfunction in late phase of experimental neonatal asphyxia in rats. *Neurochemistry International* 2011; 58:582-590.
- 16) Zaniga I.; Van den Bergh R.; Bulckaert D.; *et al.* Characteristics and mortality of neonates in an emergency obstetric and neonatal care facility, rural Burundi. *Public Health Action* 2013; 3(4).
- 17) Rivers J. R.; Sutherland B. A.; Ashton J. C. Characterization of a rat hypoxia-ischaemia model where duration of hypoxia is determined by seizure activity. *Journal of Neuroscience Methods* 2011; 197:92-96.
- 18) Takada S. H.; Sampaio C. A. G.; Allemandi W.; *et al.* A modified rat modelo f neonatal anoxia: Development and Evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *Journal of Neuroscience Methods* 2011; 198:62-69.
- 19) Rodrigues F. P. M. Impotência dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. *J Pediatr* 1998; 74(2):91-98.
- 20) Terry T. L. Fibroblastic overgrowth of Persistent túnica vasculosa lentis in infants born prematurely. *Report of Cases – Clinical Aspects* 1942; 262-284
- 21) Tian Y.; Gawlak G.; O'Donnell J. J.; *et al.* Activation of VEGF receptor-2 mediates endothelial permeability caused by cyclic stretch. *The Journal of Biological Chemistry* 2016.
- 22) Frank L.; Groseclose E.E. Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatric Research* 1984; 3:240–244.
- 23) Gonçalves F. L. L.; Figueira R. L. Simões A. L. B.; Sbragia L.; *et al.* Effect of corticosteroids and lung ventilation in the VEGF and NO pathways in congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int* 2014; 30:1207-1215.
- 24) Maniscalco W. M.; Watkins R. H.; D'Angio C. T. D.; Ryan R. M. Hyperoxic Injury Decreases Alveolar Epithelial Cell Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Neonatal Rabbit Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997; 16:557-567.
- 25) Sbragia L.; Nassr A. C. C.; Gonçalves F. L. L.; *et al.* VEGF receptor expression. Decreases during lung development in congenital diaphragmatic hérnia induced by nitrofen. *Brazilian Journl of Medical and Biologicl Research* 2014; 47(2):171-178.

- 26) Okazaki K.; Kusaka T.; Kondo M.; *et al.* Temporal alteration of serum G-CSF and VEGF levels in perinatal asphyxia treated with head cooling. *Cytokine* 2012; 60:812-814.
- 27) Gallindo R. M.; Gonçalves F. L. L.; Figueira R. L.; Sbragia L.; *et al.* Ventilation causes pulmonary vascular dilation and modulates the NOS and VEGF pathway on newborn rats with CDH. *Journal of Pediatric Surgery* 2015; 50:842-848.
- 28) Shimidt A. F.; Gonçalves F. L. L.; Sbragia L.; *et al.* Prenatal retinoic acid improves lung vascularization and VEGF expression in CDH rat. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207:76.e25-32.
- 29) Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36:1-37.
- 30) Dell'anna E.; Chen Y.; Loidl F.; Andersson K.; Luthman J.; Goigny M.; Rawal R.; Lindgren T.; Herrera-Marchitz M.; Short-term effects of perinatal asphyxia studied with Fos-immunocytochemistry and in vivo microdialysis in the rat. *Exp Neurol* 1995; 131:279-87.
- 31) Buwalda B.; Nyakas C.; Vosselman H. J.; Luiten P. G. M. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav Brain Res* 1995; 67:85-90.
- 32) Andreollo N. A. *et al.* Rat's age versus human's age: what is the relationship?. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2012; 25(1)49-51.
- 33) Weitzdörfer R.; Höger H.; *et al.* Differences in Hippocampal Protein Expression at 3 Days, 3 Weeks, and 3 Months Following Induction of Perinatal Asphyxia in the Rat. *Journal of Proteome Research* 2008; 7:1945-1952.
- 34) Satas S.; Loberg E. M.; Porter H.; *et al.* Effect of Global Hypoxia-Ischaemia followed by 24h of Mild Hypothermia on Organ Pathology and Biochemistry in a Newborn Pig Survival Model. *Biol Neonate* 2003; 83:146-156.
- 35) Voelkel N. F.; Vandivier R. W.; Tudor R. M. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:209-221.
- 36) Ekerbicer N.; Tarakci F.; Barut T.; Inan S. Immunolocalization of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in lung tissues after acute hemorrhage in rats. *Acta histochemica* 2008; 110:285-293.
- 37) Fukai M. U.; Nakamura Y. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer Lett* 2008; 266(1):37-52.
- 38) Sands M.; Howell K.; Costello C.M.; McLoughlin P. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respiratory Research* 2011; 12-17.

- 39) Waltenberger J.; Claesson-Welsh L.; Siegbahn A.; Shibuya M.; Heldin C. Different Signal Transduction Properties of KDR and Flt1, Two Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(43):26988-26995.
- 40) Julian R. J. The Response of the Heart and Pulmonary Arteries to Hypoxia, Pressure, and Volume. A Short Review. *Poultry Science* 2007; 86:1006-1011.
- 41) Gerosa C.; Fanni D.; Puddu M.; Locci G.; Obinu E.; Fanos V.; Faa G. Histological markers of neonatal asphyxia: the relevant role of vascular changes. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine* 2014; 3(2)
- 42) Toporsian M. & Ward M. E. Hyporeactivity of Rat Diaphragmatic Arterioles after Exposure to Hypoxia *In Vivo*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1572-1578.
- 43) van Vonderen J. J.; Roest A. A. W.; Siew. M. L.; *et al.* Measuring Physiological Changes during the Transition to Life after Birth. *Neonatology* 2014; 105:230-242.
- 44) Taniguchi H.; Andreasson K.; The Hypoxic Ischemic Encephalopathy Model of Perinatal Ischemia. *Journal of Visualized Experiments* 2008; 21.
- 45) Martins F. F. Anemia do Recém-nascido Pretermo. In: *O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar* [online]. FIOCRUZ 2004;. 564 p.
- 46) Chen C. A. Diagnostic Role of B-Type Natriuretic Peptide in Clinical Myocardial Injury related to Neonatal Asphyxia. *Pediatrics and Neonatology* 2016; 57:87-88.
- 47) van Bel F.; Groenendaal F. Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia. *Seminars in Perinatology* 2016; (40) 152-159.
- 48) Enweronu-Laryea C. C.; Nkyekyer K.; Rodrigues O. P. The impact of improved neonatal intensive care facilities on referral pattern and outcome at a teaching hospital in Ghana. *Journal of Perinatology* 2008; 28:561-565.
- 49) Chen N.; Ma C. N.; Zhao M.; Zhang Y. J. Role of VEGF gene polymorphisms in the clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 2015; 14(4):16006-16011.
- 50) Mian Q.; Cheung P.; O'Reilly M.; *et al.* Spontaneously Breathing Preterm Infants Change in Tidal Volume to Improve Lung Aeration Immediately after Birth. *The Journal of Pediatrics* 2015; 167:274-278.
- 51) Li E. S.; Cheung P.; O'Reilly M.; *et al.* Exhaled CO₂ Parameters as a Tool to Assess Ventilation-Perfusion Mismatching during Neonatal Resuscitation in a Swine Model of Neonatal Asphyxia. *PLoS ONE* 2016; 11(1).

APÊNDICES

9. Apêndices

APÊNDICE A

Tabela 4. Resultados das avaliações biométricas do grupo AV.

AV			
RN	PC	PPT	PPT/PC
1	5,2182	0,1402	0,0269
2	4,4758	0,0977	0,0218
3	5,8628	0,1358	0,0232
4	5,5037	0,0968	0,0176
5	5,4857	0,1176	0,0214
6	6,0971	0,1498	0,0246
7	5,6967	0,1154	0,0203
8	5,8707	0,1180	0,0201
MÉDIA	5,5263	0,1214	0,0220
DP	0,5053	0,0193	0,0029

AV: Asfixia Ventilado. RN: Recém-nascido. PC: Peso Corporal. PPT: Peso Pulmonar Total. PPT/PC: razão Peso Pulmonar Total/Peso Corporal.

Tabela 5. Resultados das avaliações biométricas do grupo A.

A			
RN	PC	PPT	PPT/PC
1	5,4599	0,2106	0,0386
2	5,7651	0,1515	0,0263
3	5,6424	0,1501	0,0266
4	5,7987	0,1402	0,0242
5	5,4951	0,1500	0,0273
6	5,7651	0,1515	0,0263
7	5,8135	0,1525	0,0262
8	5,2172	0,1456	0,0279
MÉDIA	5,6196	0,1565	0,0279
DP	0,2123	0,0222	0,0044

A: Asfixia. RN: Recém-nascido. PC: Peso Corporal. PPT: Peso Pulmonar Total. PPT/PC: razão Peso Pulmonar Total/Peso Corporal.

Tabela 6. Resultados das avaliações biométricas do grupo C.

C			
RN	PC	PPT	PPT/PC
1	5,0785	0,1593	0,0314
2	6,0803	0,1900	0,0312
3	5,2083	0,1919	0,0368
4	5,7259	0,2129	0,0372
5	5,0323	0,1622	0,0322
6	6,2928	0,1521	0,0242
7	4,9381	0,1440	0,0292
8	5,8760	0,1695	0,0288
MÉDIA	5,5290	0,1727	0,0314
DP	0,5276	0,0234	0,0043

C: Controle. **RN:** Recém-nascido. **PC:** Peso Corporal. **PPT:** Peso Pulmonar Total. **PPT/PC:** razão Peso Pulmonar Total/Peso Corporal.

Tabela 7. Resultados das avaliações biométricas do grupo CV.

CV			
RN	PC	PPT	PPT/PC
1	4,9929	0,1582	0,0317
2	5,9675	0,1524	0,0255
3	5,5408	0,1349	0,0243
4	5,6167	0,1211	0,0216
5	5,0817	0,1443	0,0284
6	5,3936	0,1991	0,0369
7	5,4188	0,1590	0,0293
8	5,6969	0,1239	0,0217
MÉDIA	5,4636	0,1491	0,0274
DP	0,3189	0,0249	0,0052

CV: Controle. **RN:** Recém-nascido. **PC:** Peso Corporal. **PPT:** Peso Pulmonar Total. **PPT/PC:** razão Peso Pulmonar Total/Peso Corporal.

APÊNDICE B

Tabela 8. Resultados das avaliações da morfometria vascular das arteríolas pré-acinares de resistência. Valores da espessura da camada média (ECM).

	AV	A	C	CV
	0,37602	0,28155	0,50069	0,43382
	0,44512	0,54635	0,54101	0,46804
	0,32684	0,39312	0,37341	0,46633
	0,42722	0,49144	0,35312	0,69316
	0,31350	0,45135	0,70009	0,31573
	0,38411	0,60524	0,79554	0,33050
	0,27383	0,52373	0,33809	0,39284
	0,42382	0,50512	0,70922	0,35387
	0,58440	0,53979	0,59391	0,33540
	0,25579	0,48414	0,52935	0,58860
	0,30813	0,49647	0,57173	0,31192
	0,38339	0,58690	0,70810	0,41071
	0,45633	0,48897	0,51787	0,43018
	0,35908	0,33723	0,44015	0,52768
	0,35884	0,66305	0,67034	0,31534
	0,29559	0,41641	0,72845	0,40719
	0,51427	0,53428	0,43423	0,34173
	0,51329	0,39616	0,42303	0,64022
	0,37995	0,43262	0,41342	0,44961
	0,41593	0,32828	0,63290	0,51889
	0,45947	0,42918	0,69249	0,68825
	0,34175	0,32098	0,42636	0,43606
	0,23362	0,45351	0,58311	0,44726
	0,56200	0,41640	0,75210	0,68168
	0,49797	0,53032	0,68974	0,45923
	0,46070	0,29750	0,52308	0,53495
	0,42671	0,53006	0,40262	0,31772
	0,42444	0,45361	0,34191	0,36823
	0,59432	0,37284	0,65038	0,62456
	0,52682	0,51486	0,38968	0,37918
	0,29665	0,65376	0,70848	0,49745
	0,40572	0,64811	0,60395	0,47978
MÉDIA	0,40667	0,48125	0,55433	0,45113
DP	0,09325	0,10037	0,13841	0,11366

AV: Asfixia Ventilado. A: Asfixia. C: Controle. CV: Controle Ventilado.

APÊNDICE C

Tabela 9. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo AV.

RN	CORTES	AV		
		Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	1,5	1,5	1,5
	2	2	1,5	1,5
	3	2	1,5	2
2	1	2	1,5	2
	2	2,5	2	2
	3	2	1,5	2
3	1	DPA	2,5	DPA
	2	2,5	2	2,5
	3	2	2,5	2,5
4	1	2	2	2
	2	1,5	2	1,5
	3	1,5	1,5	1

AV: Asfixia Ventilado. RN: Recém-nascido. DPA: Desvio-padrão alto.

Tabela 10. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo A.

RN	CORTES	A		
		Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	2	1,5	2
	2	1,5	2	1,5
	3	2	1,5	1,5
2	1	2	1,5	2,5
	2	2,5	1,5	2,5
	3	2	2	2
3	1	2	2	3
	2	2	1,5	3
	3	2	1,5	3
4	1	3	2	3
	2	3	2	3
	3	3	1,5	3

A: Asfixia. RN: Recém-nascido.

Tabela 11. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo C.

C				
RN	CORTES	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	1,5	1,5	1,5
	2	1,5	1,5	1,5
	3	1,5	1,5	1,5
2	1	1,5	1,5	1
	2	1	1	1
	3	1	1	1
3	1	1,5	1,5	1,5
	2	1,5	1,5	1,5
	3	1,5	1,5	1,5
4	1	1,5	1,5	1,5
	2	1,5	1,5	1,5
	3	CN	CN	CN

C: Controle. RN: Recém-nascido. CN:Controle Negativo.

Tabela 12. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR2 em pulmão do grupo CV.

CV				
RN	CORTES	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	2,5	2	2,5
	2	2,5	1,5	2
	3	DPA	2	2
2	1	1,5	1,5	2
	2	1,5	1,5	2
	3	1,5	1,5	2
3	1	1,5	1,5	2
	2	1,5	1,5	2
	3	1,5	1	1,5
4	1	DPA	2	2,5
	2	2,5	1,5	2,5
	3	2,5	2	2

CV: Controle Ventilado. RN: Recém-nascido. DPA: Desvio-padrão alto.

Tabela 13. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo AV.

RN	CORTES	AV		
		Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	2	2	2
	2	2	DPA	DPA
	3	2,5	2,5	2,5
2	1	2	2	2
	2	2	2	DPA
	3	2	2	2
3	1	3	3	3
	2	3	2,5	2,5
	3	3	3	3
4	1	2,5	2,5	2,5
	2	2,5	2,5	2,5
	3	2,5	2,5	2,5

AV: Asfixia Ventilado. RN: Recém-nascido. DPA: Desvio-padrão alto.

Tabela 14. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo A.

RN	CORTES	A		
		Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	*	*	*
	2	*	*	*
	3	*	*	*
2	1	2,5	DPA	2,5
	2	2,5	2,5	2,5
	3	2,5	2	2
3	1	2	2,5	2,5
	2	2	2	2
	3	2	2	2
4	1	2,5	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2

A: Asfixia. RN: Recém-nascido. DPA: Desvio-padrão alto. * Lâmina danificada.

Tabela 15. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo C.

C				
RN	CORTES	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2
2	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	1,5	1,5	1,5
3	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2
4	1	2	2	2
	2	3	2,5	2,5
	3	CN	CN	CN

C: Controle. **RN:** Recém-nascido. **CN:**Controle Negativo.

Tabela 16. Resultado do score da avaliação por imunoistoquímica da expressão de VEGFR1 em pulmão do grupo CV.

CV				
RN	CORTES	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3
1	1	2,5	2,5	2,5
	2	2,5	2,5	2,5
	3	2,5	2,5	2,5
2	1	2	2	2,5
	2	2	2,5	2,5
	3	2	2	2,5
3	1	2	2	2,5
	2	2	2,5	2,5
	3	2	2,5	2,5
4	1	2,5	2,5	2,5
	2	2,5	2,5	2,5
	3	2,5	2,5	3

CV: Controle Ventilado. **RN:** Recém-nascido.