

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E
ALANTOIDEANO DO EQUUS CABALLUS EM DIFERENTES
FASES DA GESTAÇÃO**

LUIZ FRANCISCO ZANELLA

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista , “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, Área de Reprodução Animal.**

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Botucatu - SP

Junho - 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Zanella, Luiz Francisco.

Análise bioquímica do líquido amniótico e alantoideano do *Equus caballus* em diferentes fases da gestação / Luiz Francisco Zanella. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Assunto CAPES: 50504002

1. Equino - Reprodução

CDD 636.20824

Palavras-chave: Análise bioquímica; Equino; Líquidos fetais

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome do autor: ZANELLA, Luiz Francisco.

Título: Análise bioquímica do líquido amniótico e alantoideano do equus caballus em diferentes fases da gestação.

.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução animal.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes _____

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim- Alvarenga _____

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira _____

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Wilter Russiano Vivente _____

FCAV – UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. Mara Regina Stipp Balarin _____

UEL – Londrina

Botucatu, 30 de Junho de 2008.

Dedico este trabalho a
Aninha, o maior presente
Que o universo me deu...

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. A todas elas minha eterna gratidão:

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp Campus de Botucatu.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Doutorado e, a acolhida calorosa que recebi. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes pela orientação, exemplo, amizade, paciência e confiança. Muito Obrigado! Esforçarei-me ao máximo para ser um profissional como o senhor... eu prometo!

Ao Prof. Dr. Gercio Luiz Bonesi pelo fornecimento do material biológico, sem o qual, esse trabalho não seria realizado. Muito obrigado!

À doutoranda Carla Fredrichesen pela ajuda “quando os compromissos e a distancia me impediam de estar presente”.

Ao Prof. Dr. Agostinho Ludovico, ex-coordenador do curso de Medicina Veterinária da UNOPAR, pelo apoio e incentivo enquanto coordenador. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Werner Okano, atual coordenador do curso de Medicina Veterinária da UNOPAR, pelo apoio e incentivo. Muito obrigado!

Aos Profs. Dr. Luiz César Silva e Ms. Luiz Álvaro responsáveis pelo Laboratório de Moléstias Infecciosas da UNOPAR, pelas orientações e realização da eletroforese. Muito obrigado!

Ao Prof. Ms. Flávio A. Barca Jr. pelo delineamento estatístico do experimento.
Muito obrigado!

A Profa. Regina Kiomi Takahira pelas orientações e realização dos exames bioquímicos. Muito obrigado!

À residente Lia Rezende do Laboratório Clínico pelo auxílio para a realização dos exames bioquímicos. Muito obrigado!

Aos alunos Paulo da Silva (Tamarãna) e Caroline Manfrin (Carol) pelo companheirismo no “dia a dia” e, auxílio na realização da parte experimental. Sem vocês, seria mais difícil! Muito obrigado!

Aos amigos Raquel Cristina Gonçalves, Luiz Fernando C. Coelho, Silvia M. Trapp e José Adauto Gonçalves pelo apoio e companheirismo durante esses anos. Muito obrigado!

A Profa. Aline Tramontini pela confecção do Abstract. Muito obrigado!

A Minha esposa “Profa.” Mirian companheira de todas as horas, pelo apoio incondicional e, principalmente, pela compreensão das horas ausentes... Muito obrigado!

A “Deus” por conceder-me a graça da vida! O muito obrigado! Ainda é dizer muito pouco...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Grupos experimentais.....	13
4.2. Colheita das amostras.....	13
4.3. Determinação da idade fetal.....	13
4.4. Análise bioquímica dos líquidos fetais.....	16
4.5. Identificação da alfa-fetoproteína.....	18
4.6. Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS.....	20
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9. Artigos Científicos.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Amniocentese para colheita de líquidos fetais em terço inicial da gestação.....	14
FIGURA 02 - Amniocentese para colheita de líquidos fetais em terço médio da gestação.....	14
FIGURA 03 - Líquido amniótico e alantoideano eqüino.....	14
FIGURA 04 - Ilustração da aferição do comprimento do embrião com idade gestacional de 1 mês.....	15
FIGURA 05 - Ilustração da aferição do comprimento do feto com idade gestacional de 8 meses.....	15
FIGURA 06 - Representa o gráfico para a Fosfatase alcalina em U/L no líquido amniótico.....	21
FIGURA 07- Representa o gráfico da glicose em mg/dL no líquido amniótico	22
FIGURA 08 - Representa o gráfico da Proteína Total em mg/dL no líquido amniótico.....	23
FIGURA 09 - Representa o gráfico da Uréia em mg/dL no líquido amniótico...	24
FIGURA 10 - Representa o gráfico da creatinina em mg/dL no líquido amniótico.....	25
FIGURA 11 - Representa o gráfico do Cálcio em mg/dL no líquido amniótico..	26
FIGURA 12 - Representa o gráfico do íon Cálcio em mEq/L no líquido amniótico.....	27
FIGURA 13 - Representa o gráfico do íon Na em mEq/L no líquido amniótico.	28

FIGURA 14 - Representa o gráfico do íon K em mEq/L no líquido amniótico...	29
FIGURA 15 - Representa o gráfico para a Fosfatase alcalina em U/L no líquido alantoideano.....	30
FIGURA 16 - Representa o gráfico da glicose em mg/dL no líquido alantoideano.....	31
FIGURA 17 - Representa o gráfico da Proteína Total em mg/dL no líquido alantoideano.....	32
FIGURA 18 - Representa o gráfico da Uréia em mg/dL no líquido alantoideano.....	33
FIGURA 19 - Representa o gráfico da creatinina em mg/dL no líquido alantoideano.....	34
FIGURA 20 - Representa o gráfico do Cálcio em mg/dL no líquido alantoideano.....	35
FIGURA 21 - Representa o gráfico do íon Cloreto em mEq/L no líquido alantoideano.....	36
FIGURA 22 - Representa o gráfico do íon Sódio em mEq/L no líquido alantoideano.....	37
FIGURA 23 - Representa o gráfico do íon Potássio em mEq/L no líquido alantoideano.....	38
FIGURA 24 - Representa o gráfico obtido da comparação da análise bioquímica do líquido amniótico e alantoideano, para cada fase do período gestacional.....	40
FIGURA 25 - Ilustração da eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Fosfatase Alcalina em U/L no líquido amniótico.....	21
TABELA 02. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da glicose em mg/dL no líquido amniótico.....	22
TABELA 03. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Proteína Total em mg/dL no líquido amniótico.....	23
TABELA 04. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Uréia em mg/dL no líquido amniótico.....	24
TABELA 05. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Creatinina em mg/dL no líquido amniótico.....	25
TABELA 06. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do Cálcio em mg/dL no líquido amniótico.....	26
TABELA 07. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Cloreto em mEq/L no líquido amniótico.....	27
TABELA 08. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Sódio em mEq/L no líquido amniótico.....	28

TABELA 09. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Potássio em mEq/L no líquido amniótico.....29

TABELA 10. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Fosfatase Alcalina em U/L no líquido alantoideano.....30

TABELA 11. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da glicose em mg/dL no líquido alantoideano.....31

TABELA 12. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Proteína Total em mg/dL no líquido alantoideano.....32

TABELA 13. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Uréia em mg/dL no líquido alantoideano..33

TABELA 14. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Creatinina em mg/dL no líquido alantoideano.....34

TABELA 15. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do Cálcio em mg/dL no líquido alantoideano.....35

TABELA 16. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Cloreto em mEq/L no líquido alantoideano..... 36

TABELA 17. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Sódio em mEq/L no líquido alantoideano.....37

TABELA 18. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Potássio em mEq/L no líquido alantoideano.....38

TABELA 19. Expressa os valores das médias obtidas da comparação estatística entre o líquido amniótico e alantoideano dos elementos bioquímicos analisados para cada fase do período gestacional.....39

Nome do autor: ZANELLA, L. F. **Análise bioquímica do líquido amniótico e alantoideano do *Equus caballus* em diferentes fases da gestação.** 2008.p.
Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo

Os líquidos fetais possuem diversas funções que são vitais para o feto. Para a espécie eqüina até o presente momento, não está totalmente definida a composição bioquímica do líquido amniótico no decorrer da gestação. O presente trabalho teve como objetivo verificar a composição bioquímica do líquido amniótico e alantoideano das éguas em diferentes fases da gestação. Para isso analisou-se 60 amostras de fluidos fetais, empregando-se kits comerciais para se determinar a concentração bioquímica da Fosfatase Alcalina, Glicose, Proteínas Totais, Uréia, Creatinina, Cálcio, Cloreto, Sódio e Potássio durante a gestação. A concentração da alfa-fetoproteína foi avaliada empregando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. A concentração da Fosfatase Alcalina no líquido amniótico foi maior quando comparada ao líquido alantoideano nas três fases da gestação ($p < 0,05$). Para a glicose o valor médio entre os dois fluidos não apresentou variações ($p < 0,05$). Para a Proteína total o valor médio do líquido amniótico foi maior que o alantoideano ($p < 0,05$). A Uréia sofreu variações na concentração entre as fases, mas não há diferenças dos valores médios ($p > 0,05$) entre os fluidos. Para a Creatinina os valores presentes no líquido alantoideano são mais altos que os valores do líquido amniótico ($p < 0,05$). As concentrações dos íons Cloreto e Sódio apresentaram-se mais elevados ($p < 0,05$) no líquido amniótico. As concentrações dos íons Cálcio e Potássio foram mais elevadas nos líquidos alantoideanos ($p < 0,05$). A eletroforese identificou duas bandas protéicas que podem ser a alfa-fetoproteína, ela parece aumentar a concentração durante o período gestacional. Porém, faltam estudos na espécie eqüina para a comparação dos resultados do presente trabalho.

Palavras-Chave: eqüino, líquidos fetais, análise bioquímica.

Author's name: ZANELLA, L. F. **Biochemical assay of the amniotic and allantoic fluids of *Equus caballus* in different stages of pregnancy.** 2008.p. Doctorate Thesis in Veterinary Medicine, Area of Animal Reproduction. School of Veterinary Medicine and Zootechnology, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Abstract

Fetal fluids play a vital role in the development of the fetus. The biochemical composition of the amniotic fluid along pregnancy in horses had not been described until this present study. Sixty samples of fetal fluids were collected and the concentrations of Alkaline Phosphatase (FA), Glucose, Total Proteins (PT), Urea, Creatinin, Calcium (Ca), Chloride (Cl), Sodium (Na) and Potassium (K) along pregnancy were determined using commercially available kits. The levels of alpha-fetoprotein (AFT) were measured by polyacrylamide gel electrophoresis. During the three stages of pregnancy the concentrations of FA in the amniotic fluid were higher than those determined in the allantoic fluid ($p < 0,05$). The glucose levels did not differ between the fluids ($p < 0,05$). The mean values for the concentrations of PT were higher in the amniotic fluid than in the allantoic ($p < 0,05$). The urea levels differ among the pregnancy stages, but there were no differences in the mean values of urea ($p > 0,05$) between the two fluids. The concentrations of creatinin obtained in the allantoic fluid were higher than those obtained in the amniotic fluid ($p < 0,05$). The concentrations of Cl and Na were elevated ($p < 0,05$) in the amniotic fluid. The levels of the ions Ca e K were higher in the allantoic fluid ($p < 0,05$). Polyacrylamide gel electrophoresis identified two protein bands that could be alpha-fetoprotein, which appears to have its concentration increased during pregnancy. There is a need for more studies in the biochemical composition of fetal fluids in horses to compare the results obtained in this study.

Keywords: horse, fetal fluids, biochemical assays.

1. INTRODUÇÃO:

Para a espécie eqüina até o presente momento, não está totalmente definida a composição bioquímica do líquido amniótico no decorrer da gestação. Os trabalhos que versam sobre o assunto são escassos. Portanto, ainda não existem métodos capazes de determinar, com exatidão, o grau de maturação de alguns órgãos. (VAALA, HOUSE, 2002). Assim, ainda é difícil estabelecer, juntamente com outros métodos aplicados em perinatologia, a idade gestacional do concepto eqüino e, por conseguinte, estabelecer o nível de estresse que esse produto irá enfrentar no momento do parto (WILLIAMS et al., 1992; VAALA, HOUSE, 2002).

O embrião eqüino, assim como os outros mamíferos, se desenvolve no interior do útero materno. As funções vitais para o desenvolvimento e a manutenção da vida fetal como a oxigenação, nutrição e a remoção das excretas nitrogenadas são realizadas pela circulação placentária e, neste contexto, os líquidos fetais desempenham papéis fundamentais tanto na gestação como no parto das éguas (PRESTES, 2006).

Após a fertilização do óvulo, na ampola do oviduto, tem início o processo de clivagem pelo qual o zigoto se divide em pequenas células denominadas de blastômeros (LANDIM-ALVARENGA, 2006). Por volta do 4.º ao 6.º dia após a ocorrência da fecundação, o embrião do eqüino deixa a tuba e migra para o corno uterino (FLOOD, 1992). Neste momento, o embrião encontrar-se-á no estágio de mórula ou blastocisto inicial. As células do embrião compactado se dividem para formar uma mórula de 32 células, que se caracteriza, por apresentar um pequeno grupo de células no interior da estrutura rodeada externamente por outro grupo de células. São estas células localizadas externamente que formarão o trofoblasto. Posteriormente, ele originará o cório ou, como também é conhecida, a porção materna da placenta. Já as células da mórula, localizadas internamente, originarão o embrião (GUINTER, 1998).

O embrião eqüino ainda não se encontra fixado à parede uterina pois, se movimenta livremente no interior do útero materno e possui uma cápsula de glicoproteína entre o trofoblasto e a zona pelúcida cuja função, ainda não foi completamente esclarecida. Alguns pesquisadores acreditam que esta

estrutura esteja relacionada com a proteção do embrião, promovendo atividade mecânica contráctil do útero .(QUINN et al., 2004; STOUT et al., 2004).

A implantação do embrião no útero da égua ocorre entre o 25.º e o 40.º dia de gestação (FLOOD, 1992; GUINTER, 1998). Pesquisas recentes evidenciaram a participação de diversas substâncias no mecanismo de regulação da implantação, dentre elas, merecem destaque as citocinas, os hormônios, as enzimas e outros fatores como (insulin growth factorII e o epidermal growth factor) (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Uma vez estabelecida a implantação, tem-se o início do processo de placentação, que consiste na justaposição das vilosidades do corio fetal com as criptas da mucosa uterina. A placenta é um órgão situado entre a mãe e o feto e cuja função está relacionada com: suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de detritos proveniente do metabolismo fetal bem como, produção de hormônios e regulação do ambiente uterino. A placenta no eqüino se forma por nidação superficial e, portanto, ela é classificada como adeciduada ou semiplacenta.

O número de camadas de tecido uterino que se relaciona com o tecido fetal varia entre as espécies. Portanto, para a classificação das placentas também se deve levar em consideração o número de camadas que constituem o tecido uterino (LANDIM-ALVARENGA, 2006) e o tipo de arranjo entre as vilosidades do cório e do alantóide (GRUNERT, BIRGEL, 1989). Sendo assim, a placenta eqüina é considerada epitélío-corial.

Para aumentar a área de contato entre a parte fetal e a uterina, foram formadas estruturas denominadas de vilosidades e microvilosidades. Portanto, com base na relação anatômica que se estabelece entre o cório e o epitélío uterino, pode-se evidenciar quatro tipos de configurações. Nas éguas essa configuração é do tipo difusa (LEISER, KAUFMANN. 1994), pois o alantocório apresenta-se fixado ao endométrio uterino por microcotilédones distribuídos de maneira difusa por todo corno do útero, com exceção de uma pequena área no interior da cérvix denominada de estrela cervical (TROEDSSON, SAGE, 2001).

Uma particularidade dessa espécie, no que diz respeito à placentação, é que nas primeiras semanas de vida o eqüino apresenta a placenta do tipo coriovitelínica. Entre a quarta e a quinta semana, conforme o alantóide se

desenvolve, a placenta se torna corioalantoideana (GUINTER, 1998; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

À medida que ocorre o desenvolvimento do embrião, o trofoblasto se funde com as membranas internas das células da mesoderme, formando o cório. O cório envolve externamente todo o embrião e as outras três membranas fetais: o âmnio, o saco vitelino e o alantóide.

O saco vitelino nos mamíferos se torna vestigial em poucas semanas, mas nos eqüinos ele é bastante proeminente nas quatro primeiras semanas de vida do embrião, e parece ter um papel importante na nutrição embrionária (FLOOD, 1992; PRESTES, 2006).

O âmnio é formado a partir de dobras do trofoblasto juntamente com a mesoderme avascular, e circunda completamente todo o embrião. Ele é constituído por dois folhetos e entre eles há o espaço amniótico contendo o líquido amniótico (ASBURY, LeBLANC. 1993).

Antes que a parede abdominal se feche, já no estágio fetal, uma projeção do intestino se estende em direção ao tecido mesodérmico solto. Esta estrutura forma o saco alantoidiano que também é constituída por dois folhetos embrionários. Um folheto interno que se encontra bem próximo ao folheto interno do âmnio formando o alantoâmnio e um externo, que se funde ao cório formando o alantocório. Entre o alantoâmnio e o alantocório evidencia-se o espaço alantoidiano que recobre todo o embrião eqüino (BJÖKMAN, 1973; LEISER, KAUFMANN, 1994; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

O alantoâmnio e o alantocório juntam-se aos vasos umbilicais sendo duas artérias e uma veia e formam assim o cordão umbilical. O cordão também contém o úraco, estrutura responsável pela conexão entre a bexiga fetal e a cavidade alantoidiana. O cordão estabelece o contato entre os envoltórios maternos e fetais (ASBURY, LeBLANC. 1993; LEISER, KAUFMANN. 1994).

2. Revisão de literatura:

O líquido amniótico no início da gestação é produzido a partir de secreções do epitélio amniótico e da urina fetal. Posteriormente, com o desenvolvimento da gestação, o esfíncter vesical impede a liberação da urina fetal para a cavidade amniótica e a saliva e as secreções nasais fetais passam a fazer parte da composição do líquido amniótico (ARTHUR, 1969).

Considerando que este fluido envolve diretamente o feto, nele podem ser encontrados pêlos, células epiteliais, resto de escamação cutânea e, nos fetos traumatizados, pode-se ainda, encontrar a presença de mecônio. Nos eqüinos o volume deste fluido varia de três a sete litros e sua coloração normal é amarelada com ligeira viscosidade e, a presença de floculações não é considerada normal.(GRUNERT, BIRGEL,1989).

O líquido alantoidiano possui origem renal, geralmente composto pela urina fetal, o seu volume, na espécie eqüina, é de 4 -10 litros e sua coloração é marrom claro, opaco e ligeiramente turvo (GRUNERT, BIRGEL,1989; FLOOD, 1992; GUINTER, 1998).

Os líquidos fetais possuem diversas funções que são vitais para o feto dentre elas, destacam-se : 1. Proteção contra choques externos, variações de temperatura e desidratação (GRUNERT, BIRGEL, 1989; WILLIAMS et al., 1992; ASBURY, LeBLANC, 1993), 2. Evitar a aderência da pele do feto à membrana amniótica, 3. Promover a lubrificação e a dilatação da via fetal durante a fase de expulsão no parto (GRUNERT, BIRGEL, 1989; ASBURY e LeBLANC, 1993) 4. Também, permite a livre movimentação e o crescimento do fetal no interior do útero (ARTHUR, 1969). 5. Inibir o crescimento bacteriano (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Nas mulheres a amniocentese e a subseqüente análise do líquido amniótico são utilizadas para detectar principalmente: doenças congênitas, defeitos de tubo neural, idade gestacional e maturidade fetal pulmonar. O exame é indicado para mulheres acima de 35 anos devido à maior probabilidade de anormalidades cromossômicas fetais (CAMPANA., et al 2003).

O grau de maturação pulmonar dos neonatos humanos é avaliado dosando-se a porcentagem de fosfatidilglicerol e pela relação da taxa de

lecitina/esfingomiélinas presentes no líquido amniótico, pois eles são constituintes do surfactante pulmonar dos fetos maduros (WILLIAMS et al., 1992). A técnica é realizada por cromatografia o que a torna inviável para a rotina da clínica veterinária. (MARTÍNEZ et al., 1999). Outra substância que está envolvida com a determinação da maturação pulmonar é o cortisol sérico (VAALA, HOUSE, 2002).

O fator hormonal mais importante no início do desencadeamento do parto é a remoção do bloqueio da contratilidade causado pela ação da progesterona (LANDIM-ALVARENGA, 2006; ERENO et al., 2007). Entretanto as observações em caprinos, ovinos, bovinos e humanos indicam que na fase final da gestação ocorre também um aumento significativo na concentração plasmática de cortisol fetal devido a estímulos no eixo hipotálamo-hipófise (BANJANIN et al., 2004; ERENO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007). Acredita-se então que a maturação do hipotálamo do feto resultaria no desenvolvimento de sinapses do núcleo paraventricular, permitindo um aumento na função neuroendócrina fetal. Assim o hipotálamo passaria a responder aos efeitos dos hormônios placentários (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

A maturidade renal, pode ser avaliada através da dosagem de uréia e creatinina presentes no líquido amniótico, no momento do parto pois diversos trabalhos mostram que há um aumento na concentração dessas substâncias no líquido alantoideano ao longo da gestação (WILLIAMS et al., 1992). O rim fetal é afuncional durante o seu período de formação, porém sua contribuição no final do processo de maturação fetal é importante para a sobrevivência do concepto (LUMBERS et al., 1985).

Na obstetrícia humana algumas enfermidades e a viabilidade fetal podem ser precisamente determinadas através do exame ultrassonográfico do feto no interior do útero, associado à composição bioquímica do líquido amniótico obtida por amniocentese, guiada por ultrassonografia (SCHIMIDT et al., 1991; VAALA, HOUSE, 2002).

Em medicina veterinária, os primeiros estudos para se analisar a fisiologia e o comportamento bioquímico do líquido amniótico, obtido por amniocentese foram realizados primeiramente em ovinos (McDOUGALL, 1949; ALEXANDER et al., 1958; MELLOR e SLATER, 1972). BONGSO E BASRUR

(1975) afirmaram que a amniocentese apresentaria aplicação limitada em medicina veterinária devido a alguns fatores como: anatomia do útero gravídico, dos sacos fetais e dos fluidos fetais. No entanto, (PRESTES et al., 2001) realizaram a dosagem bioquímica dos seguintes elementos: glucose, uréia, creatinina, Gama glutamil transferase (GGT), sódio, potássio, cloro, proteínas totais e pH no líquido amniótico de ovinos utilizando a amniocentese aos 70, 100 e 145 dias de gestação e com sucesso. Dos 26 animais utilizados no experimento apenas 01 ovelha, portadora de parto gemelar abortou após a segunda colheita realizada aos 100 dias de gestação devido a repetidas punções nas duas vesículas. Os resultados encontrados permitiram aos autores concluir que o valor do pH diminuiu ao longo da gestação. A concentração de glicose apresentou uma redução durante o período gestacional. Os valores estatísticos para a uréia mostraram não haver diferença entre 70, 100 e 145 dias. Os valores encontrados para a creatinina evidenciaram um aumento com o avanço da gestação. Os valores de GGT mostraram-se similar nos três momentos especificados para as colheitas, através de laparotomia.

Os valores encontrados para o sódio permitiram os autores concluir que houve uma redução ao longo dos três estágios. Já o potássio apresentou aos 100 dias a maior concentração. Os valores encontrados para o cloreto apresentaram o mesmo comportamento do sódio isto é, sofreram aumento no decorrer da gestação. Os valores encontrados para a proteína total foram baixos 0,14, 0,23 e 0,24g/dl aos 70, 100 e 145 dias da gestação respectivamente.

Em bovinos os primeiros autores a realizarem amniocentese foram (LEIBO, RALL, 1990). Recentemente, Breukelman et al., (2005) estudaram as características intra-uterina da morte fetal embrionária, no terço inicial da gestação correlacionando a aparência do concepto, com a taxa de frequência cardíaca, perfil bioquímico da glicoproteína associada à prenhez, (PAG) e prostaglandina F2 α (PGF2 α) após a indução da morte fetal com aglepristone. Esses autores evidenciaram a ocorrência da diminuição do líquido alantoideano durante o período de estresse fetal que antecede a morte dos fetos bovinos. Eles encontraram também, pouca alteração na taxa de frequência cardíaca em contraste ao que se observa na espécie humana.

Linderberg et al., (2002) empregaram a técnica de amniocentese descrita por Zepperitz e Grün (1991) em vacas em terço final de gestação, Os animais foram previamente infectados experimentalmente com o vírus da diarreia viral bovina (BVD). O objetivo do trabalho era obter líquidos fetais em condições de “campo” para se detectar a presença do vírus, empregando-se a técnica de (PCR). O procedimento foi aplicado em 09 vacas e nenhuma apresentou complicações decorrentes da amniocentese e, os autores puderam estabelecer um diagnóstico pré-natal de infecção por BVD, utilizando os líquidos fetais.

Li et al., (2005) estudaram as alterações da composição bioquímica dos fluidos fetais no terço inicial da gestação em bovinos clonados. Eles pretendiam encontrar respostas para a maior ocorrência de hidroalantóide e hidroâmnio nas vacas que gestam fetos obtidos através de clonagem. Eles concluíram que as principais mudanças são decorrentes de alterações no metabolismo e na atividade de transporte dos tecidos que constituem a placenta mas, algumas alterações da composição bioquímica ainda permanecem sem explicações.

MOYA et al., (2006) analisaram por citologia do liquido amniótico obtido no momento do parto, 60 novilhas nelores sendo que 20 foram inseminadas artificialmente, 20 se apresentavam gestantes pela técnica de transferência de embriões e, outras 20 apresentavam-se gestantes pela técnica de fertilização “in vitro” após aspiração folicular. A análise da citologia do liquido amniótico é utilizada em medicina humana. Ela é um método seguro empregado para a avaliação e caracterização epidermal dos fetos em gestações avançadas (AGORASTOS,1970 *apud* MOYA et al., 2006). O resultado do trabalho permitiu aos autores concluir que apesar de não ter havido diferenças estatísticas entre os três grupos estudados em questão, a citologia do liquido amniótico das células coradas pelo corante Hematoxilina-Shorr é um método confiável para se determinar o grau de maturidade fetal.

LOVELL et al., (1995) realizaram amniocentese guiada por ultra-som em cabras cujo período gestacional se encontrava entre 59–65 dias, com a finalidade de se estabelecer o diagnóstico pre-natal de manosidose um distúrbio catabólico que acomete a espécie caprina e bovina. Segundo relatos dos autores a amniocentese se mostrou segura e fácil de se realizar nos

caprinos. Dos 13 animais utilizados no experimento apenas um abortou provavelmente, em virtude de ter ocorrido a punção de um placentoma.

As avaliações dos fluidos fetais em cães são escassas. Barreto (2006) empregou o procedimento cirúrgico (cesariana) para a obtenção dos fluidos fetais de cadelas, com o intuito de avaliar a maturidade pulmonar dos fetos desta espécie e, relatou que o teste de Clements modificado pode ser empregado para a avaliação da viabilidade fetal e maturidade pulmonar. Afirmou também, que a análise celular com Azul de nilo (0,1%) permite a observação de células morfológicamente diferentes permitindo assim, avaliar a maturidade pulmonar fetal. Outro dado analisado pela autora foi a densidade óptica dos líquidos fetais. Ela concluiu que valores superiores a 0,150 são indicativos de maturidade pulmonar para a espécie canina.

Em outro estudo BARRETO et al., (2006) avaliaram a composição bioquímica dos fluídos alantoideano e amniótico totalizando 20 amostras obtidas de 06 cadelas entre 30 a 40 dias de gestação. As variáveis analisadas foram: proteínas totais, glicose, uréia, creatinina, cloretos totais e glicose. Dos constituintes propostos para a análise, os valores de proteínas totais apresentaram diferença estatística entre os fluidos alantoideano e amniótico. Esse resultado reflete o fato das proteínas se constituírem nos elementos mais abundantes dos fluidos fetais e que sofrem maior influência da fisiologia fetal. A avaliação dos outros elementos não apresentou diferença estatística, podendo refletir então a sincronia dos fluidos na manutenção do equilíbrio eletrolítico nestes dois compartimentos.

As primeiras tentativas de amniocentese na espécie eqüina, antes do desenvolvimento da ultrassonografia, causaram um alto índice de abortos nas éguas gestantes, fato que desencorajou as pesquisas sobre a aplicabilidade do procedimento para a espécie e que devido à conformação anatomofisiológica das estruturas não ocorriam na espécie humana (ASBURY, LeBLANC, 1993). Porém, com o advento da ultrassonografia tornou-se possível realizar a amniocentese trans-abdominal guiada por ultra-som (RENAUDIN et al., 1997; VINCE et al., 2002). Com isso, é possível identificar com precisão, a cavidade amniótica e alantoideana, o que elevou o índice de sucesso do procedimento (SCHIMIDT et al., 1991).

Recentemente LYLE et al., (2006) desenvolveram uma técnica para colocação de cateter no interior da cavidade alantoideana com a finalidade de se poder obter amostras de líquido alantoideano em vários momentos. O procedimento foi realizado utilizando-se 29 éguas no período compreendido entre 2003 – 2005. Os animais foram sedados empregando-se a associação de dois fármacos detomidina e butorfanol e, em seguida, procedeu-se a infiltração local com lidocaína a 2% na parede abdominal das fossas paralombares. A associação dos procedimentos de laparoscopia guiada por ultrassonografia permitiu uma excelente visualização do útero e da cavidade alantoideana e elevou significativamente a taxa de sucesso do procedimento. Outro fator que colaborou sobremaneira, para elevar a taxa de eficiência da técnica, segundo os autores, foi o emprego de cateteres de borracha utilizados para nefrostomia. Os cateteres foram mantidos nas éguas do estudo conduzido em 2004 por 06 dias em média. Em outro experimento conduzido em 2005 com o cateter para nefrostomia, com a mesma finalidade foi possível mantê-lo fixado nas éguas por até 9 dias em média. Este procedimento possibilitou a colheita de fluido alantoideano nos momentos da cirurgia, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 36, 42, 50 horas após a colocação do cateter.

As complicações relatadas pelos autores foram: falhas na fixação do cateter resultando em desprendimento dos mesmos, fato que ocorreu em 03 animais. Mas, a mais grave das complicações encontradas foi a infecção ao redor do ponto de fixação do cateter que ocorria, em média, após o quinto dia de pós-operatório. Em algumas éguas essa infecção chegou mesmo, a se estender para o interior da cavidade alantoideana. No entanto esse fato não trouxe maiores complicações para as éguas pois, no ano seguinte os mesmos animais foram novamente aproveitados para outro experimento com a mesma finalidade sem contudo, apresentarem problemas para a fecundação e gestação (LYLE et al., 2006).

MURCHIE et al., (2003) realizaram uma técnica de microdiálise do líquido alantoideano equino através de laparotomia trans-abdominal, com a finalidade de se detectar a concentração de algumas drogas. Dentre elas merecem destaque a penicilina G, gentamicina e o flunexim meglumine presentes no líquido alantoideano de éguas gestantes. Das 9 éguas utilizadas

para a realização do experimento, somente 01 abortou segundo relatos do autor.

Smith et al. (1997) conseguiram com sucesso detectar a presença de herpesvírus tipo I no líquido amniótico de éguas gestantes, antes mesmo da ocorrência do abortamento.

Kochhar et al., (1997) avaliaram os líquidos fetais de 22 éguas as quais se encontravam numa mesma propriedade. Em 11 delas o parto transcorreu normalmente. As outras 11 éguas no entanto, apresentaram partos distócicos. Os fluidos foram colhidos no momento da parição por centese da bolsa alantoideana e amniótica. Nas éguas portadoras de distocias, a proteína total apresentou valores menores já os valores obtidos para a uréia, creatinina e glicose, nesse grupo foram mais altos. O valor do sódio no líquido alantoideano foi bem menor quando comparado ao valor encontrado no líquido amniótico. Os valores obtidos para a dosagem dos íons potássio e cálcio mostraram que os mesmos apresentaram-se maiores no fluido alantoideano. No entanto, os autores destacam a ausência de trabalhos e estudos que possam servir como parâmetros para se avaliar as diferenças na composição bioquímica dos líquidos fetais das éguas. A intensidade e o tipo do trabalho de parto podem interferir na composição bioquímica dos fluidos fetais nesta espécie (Kochhar et al., 1997)

Segundo JONKER (2004) a viabilidade fetal na espécie eqüina pode ser avaliada através de dosagens dos parâmetros bioquímicos, hormonais e exames ultra-sonográficos dos líquidos fetais e da placenta. Mas para tanto, se faz necessário mais estudos para se identificar a composição dos líquidos fetais em cada fase da gestação da égua.

A alfa-fetoproteína é uma glicoproteína sintetizada pelo saco vitelino fetal no início da gestação CAMPANA et al., (2003) e, posteriormente, pelo fígado do feto (KANEKO, 1997). A sua função ainda não é completamente conhecida (KANEKO, 1997). Outrossim, ela é considerada um marcador bioquímico importante para o diagnóstico pré-natal de alguns defeitos de formação congênita fetal em humanos (ALVAREZ-NAVA et al., 2003; CAMPANA et al., 2003; GORDON et al., 2003). Níveis elevados indicam defeitos do tubo neural (anencefalia, espinha bífida), cistos sacroccígeos,

obstrução esofágica, ou intestinal, necrose hepática, defeitos da parede abdominal, obstrução urinária e anormalidades renais, defeitos na osteogênese, defeitos congênitos de pele, baixo peso fetal, oligodrânio, gestação múltipla. Já os níveis baixos indicam trissomias cromossômicas como síndrome de Down, doença trofoblástica gestacional e morte fetal (ALVAREZ-NAVA et al., 2003; CAMPANA et al., 2003; GORDON et al., 2003).

Em bovinos SMITH et al., (1979) avaliaram a distribuição da AFP por radioimunoensaio nos fluidos fetais entre o terceiro e o quarto mês de gestação e, encontraram para o líquido alantoideano valores de 27- 31 µg/mL e 3 µg/mL próximo ao parto. Para o líquido amniótico os valores encontrados foram 17- 25 µg/mL entre o terceiro e o quarto mês de gestação e valores < 5 µg/mL próximo ao parto.

Em humanos a massa molecular da AFP é de 69 kDa (MAESTRI et al., 1998). Em cães BARRETO, (2006) relatou que a massa molecular da AFP seria de 66 kDa para o líquido amniótico podendo ser determinada pela técnica de eletroforese em Gel de Poliacrilamida PAGE.

SEPULVEDA et al. (1995) relataram que em humanos é possível a ocorrência de elevadas taxas de AFP no líquido amniótico sem contudo, ser identificado ao exame ultra-sonográfico qualquer anormalidade de mal formação, evidenciando a importância de se associar as técnicas para a avaliação da conformação fetal.

3. Objetivos:

3.1 Gerais:

Determinar a composição bioquímica dos líquidos fetais da espécie eqüina na fase inicial, intermediária e final da gestação

3.2 Específicos:

1. identificar os parâmetros fisiológicos dos principais eletrólitos presentes no líquido amniótico durante a gestação das éguas.
2. determinar os parâmetros fisiológicos dos principais eletrólitos presentes no líquido alantoideano durante a gestação das éguas.
3. estabelecer parâmetros bioquímicos que possam fornecer informações para a clínica obstétrica eqüina.

4. Materiais e Métodos:

4.1. Grupos experimentais:

Foram utilizadas amostras de líquidos amnióticos e alantoideanos de éguas gestantes. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, com vinte animais em cada grupo. Esta divisão se fundamentou nos três períodos clássicos da gestação (terço inicial, médio e final). O terzo inicial compreende o período até os 90 dias de gestação. O médio compreende o período entre os 90 a 240 dias de gestação e o final corresponde à idade gestacional a partir dos 270 dias de gestação.

4.2. Colheita das amostras

As amostras dos líquidos fetais foram obtidas diretamente do útero das éguas que foram abatidas no frigorífico especializado em abate e comercialização de carne eqüina, localizado na cidade de Apucarana, no estado do Paraná. No mesmo dia do abate das éguas, os úteros das mesmas eram transportados para o laboratório de Anatomia Patológica da faculdade de Medicina Veterinária da **UNOPAR** localizado na cidade de Arapongas. Onde então, se realizava a dissecação do útero e posteriormente das membranas corioalantoideana e a amniótica em seguida, se realizava alantoideocentese e amniocentese com o auxílio de agulhas 30x08¹ e seringas estéreis² de 20ml. Figuras 1 e 2. Os materiais colhidos eram colocados em tubos de ensaios de 20 mL previamente identificados Figura 3 em duplicata quando possível. Uma vez que, para os fetos com idade gestacional de até 03 meses a média dos volumes obtidos foi de 02 mL. Em seguida, as amostras foram congeladas e estocadas em freezer a -20C° para posterior avaliação (WILLIANS et al.,1992).

4.3. Determinação da idade fetal

O período gestacional na qual a égua se encontrava, no momento da colheita, foi determinado utilizando-se a metodologia proposta por ROBERTS, (1986). Figuras 4 e 5.

¹ Agulhas hipodérmicas BD

² Seringas estéreis BD.



FIGURA 01: Foto ilustrativa da amniocentese no terço inicial de gestação.

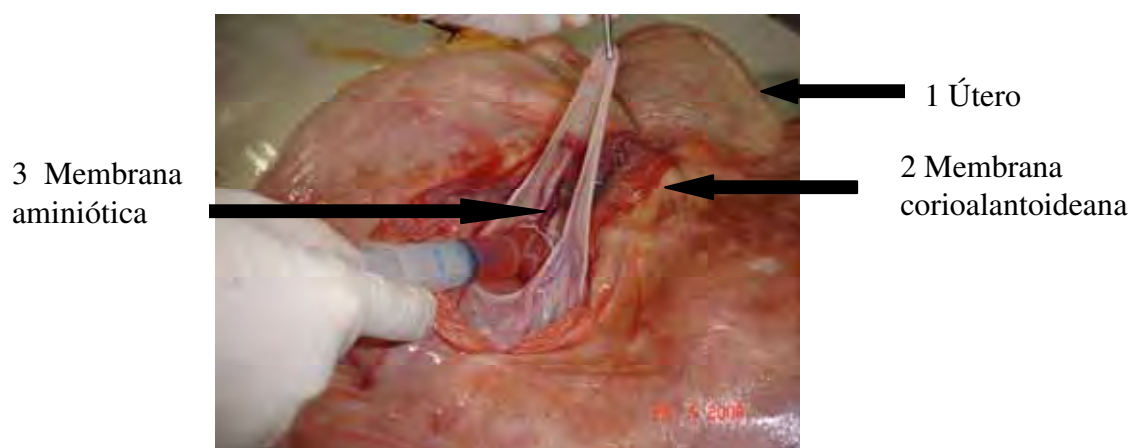


FIGURA 02: Foto ilustrativa da amniocentese realizada no terço médio da gestação, mostrando parede uterina (1); Membrana corioalantoideana (2); Membrana amniótica (3).

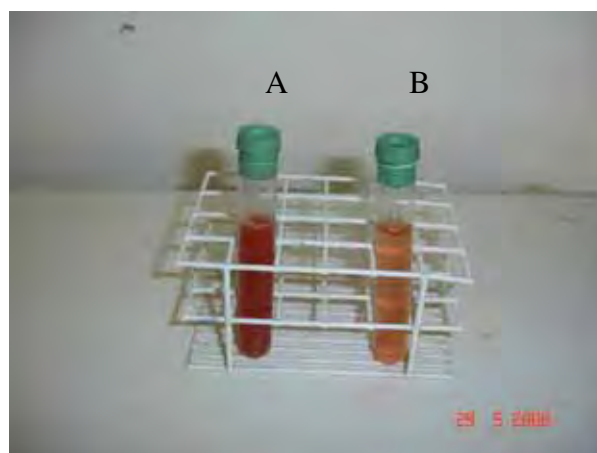


FIGURA 03: Foto ilustrativa mostrando em **A** líquido alantoideano e **B** líquido amniótico.



FIGURA 04: Foto ilustrativa do embrião com idade gestacional de 1 mês.



FIGURA 05: Foto ilustrativa da aferição do comprimento do feto com idade gestacional de 8 meses.

4.4. Análise bioquímica dos líquidos fetais:

Foram pesquisados e quantificados os seguintes elementos nos líquidos fetais das éguas: fosfatase alcalina, glicose, proteínas totais, uréia, creatinina, lactato desidrogenase e os íons cálcio, cloreto, sódio e potássio. Outra substância que se procurou identificar e avaliar o seu comportamento ao longo do período gestacional foi a alfa-fetoproteína.

Todas as dosagens foram realizadas no espectrofotômetro CELM, modelo SB-190, com exceção do sódio e potássio cuja dosagem foi realizada no fotômetro de chama CELM, modelo FC-280.

Para a dosagem da fosfatase alcalina³ a técnica empregada foi o método cinético, baseado na hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela fosfatase alcalina no soro ou plasma em pH 9,8 cuja velocidade de formação (em comprimento de onda de 450 nm) é proporcional à atividade da enzima presente.

Para a dosagem do LDH⁴ a técnica empregada foi o método cinético para determinação no plasma ou soro. A técnica baseia-se na conversão do piruvato pela LDH em lactato, transformando o NADH₂ em NAD. A velocidade de diminuição da absorbância em 340 nm é proporcional à atividade desidrogenásica presente.

A proteína total⁵ foi dosada pelo método colorimétrico (Bradford modificado) que utiliza corante Coomassie azul brilhante para detectar quantidades mínimas de proteínas. Esse corante forma um complexo com albumina e diferentes variedades de globulinas existentes no líquido e urina. A leitura em espectrofotômetro é realizada 610 nm.

Para a dosagem da glicose⁶ o método utilizado foi o enzimático-colorimétrico segundo Trinder para determinação de glicose em soro, plasma, ou outros líquidos biológicos. Baseia-se na atividade das enzimas glicose oxidase e peroxidase, em comprimento de onda de 505 nm.

³ - Fosfatase alcalina - Kit Katal.

⁴ LDH - Kit Katal

⁵ Proteínas Totais - Kit Microprote-Doles

⁶ Glicose - Kit Celm.

A creatinina⁷ foi dosada pelo método cinético para determinação da creatinina em soro, plasma, urina e líquido amniótico. A creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino, e mede-se a velocidade de formação do picrato alcalino, obtendo-se duas leituras espectrofotométricas em 510 nm.

A Uréia⁸ foi dosada pelo método enzimático-colorimétrico para determinação da uréia no sangue e urina. Ele baseia-se na hidrólise da uréia pela enzima uréase, com produção de gás carbônico e íons amônio, em 600 nm. A cor formada é proporcional à concentração de uréia presente na amostra.

O Cálcio⁹ foi dosado pelo método colorimétrico empregado para soro, plasma ou urina. O cálcio reage com a cresolftaleína complexona (púrpura de ftaleína) em meio alcalino formando um complexo intensamente corado, em 570 nm. A absorbância é proporcional à quantidade de cálcio presente na amostra

O íon Cloreto¹⁰ foi dosado pelo método colorimétrico para determinação da concentração de cloretos em amostras de soro, urina e líquido, através de reação de ponto final. Ela baseia-se na reação dos íons cloreto com tiocianato de mercúrio. Os íons tiocianato quando combinados com os íons férricos formam tiocianato férrico, de coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloretos. Leitura realizada em 470 nm

Os íons Sódio e Potássio¹¹ foram dosados pelo método de fotometria de chama para determinação de íons sódio, potássio e lítio em amostras de soro livre de hemólise. Isto se baseia-se na excitação térmica de metais alcalinos, com emissão de uma onda de frequência discreta, a qual pode ser isolada por um filtro ótico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, determina a concentração do íon na amostra.

⁷- Creatinina – Kit Katal

⁸-Uréia – Kit Katal

⁹-Cálcio – Kit Katal

¹⁰-Cloreto – Kit Labtest

¹¹-Sódio e Potássio – Kit CELM

4.5. A alfa-fetoproteína foi identificada empregando-se a eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

4.5.1 Preparo do Gel de Poliacrilamida

O gel de 1 mm de espessura foi polimerizado entre duas placas de vidro, com auxílio de espaçadores colocados entre elas, nos lados e na parte inferior. As placas foram presas uma contra a outra com garra metálica forte, sendo uma posicionada no meio de cada um dos lados e duas na parte inferior. Os bordos externos e os espaçadores foram lacrados com ágar 2% (fundido) e as placas presas foram colocadas em posição vertical sobre uma superfície plana.

A solução de gel de separação a 12%, foi preparada e colocada entre as duas placas de vidro. Acima dela, colocou-se uma camada de água deionizada, após a polimerização do gel de separação (aproximadamente 20 a 30 minutos), descartou-se a água deionizada, enxugou-se o topo do gel com um papel toalha e a placa foi completada com a solução do gel de empilhamento 3,5%.

Um pente foi introduzido na solução de gel de empilhamento antes de sua polimerização. Durante a polimerização o pente forma 14 canaletas (ou poços), onde foram aplicadas as amostras.

Após a polimerização do gel de empilhamento, o espaçador inferior foi removido e as placas, com o gel de poliacrilamida no seu interior, foram fixadas em uma cuba de eletroforese do tipo vertical.

O reservatório inferior e o superior da cuba foram preenchidos com o tampão de corrida e o pente foi cuidadosamente removido do gel de empilhamento, deixando as canaletas livres para se adicionar as amostras.

4.5.2. Corrida Eletroforética

As amostras preparadas foram aplicadas nas canaletas, com o auxílio de um micropipetador e ponteira; a primeira canaleta à esquerda sempre recebia a amostra padrão (padrão proteínas soro eqüino) que servia como controle positivo; as demais canaletas recebiam as amostras a serem testadas.

Terminada a distribuição das amostras, os eletrodos da fonte de energia elétrica foram conectados a cuba e a corrida eletroforética foi realizada a 12

mÅ por aproximadamente 02 horas (30 minutos após o azul de bromofenol ou corante traçador ter atingido o final do gel de separação).

Após a corrida, o gel de separação foi removido das placas para um recipiente plástico e corado com corante comassie Blue e documentado por meio de fotografia.

4.6. Análise estatística:

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico BioEstat 4.0 (AYRES *et al.*; 2005) sendo que os valores das classes (variáveis) que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes (Proteína e Uréia do Líquido Amniótico) foram realizados através do teste de análise de variância (ANOVA) e para verificação das diferenças entre os terços gestacionais teste de Tukey. Nas classes a serem avaliadas que não obedeciam aos critérios de distribuição normal e/ou variâncias semelhantes (demais classes do líquido Amniótico e todas do Líquido Alantóideano), os valores foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1998) e as comparações necessárias através do teste de Student-Newman-Keuls. O valor de significância mínima foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. Resultados

Foram colhidos um total de 60 amostras de líquido alantoideano e amniótico, sendo 20 para gestações com idades iguais ou menores a 03 meses, 20 para gestações com idades entre 4 – 8 meses e, 20 para gestações com idades maiores ou iguais a 9 meses.

Os valores encontrados para média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados, para cada variável do líquido amniótico estão representados nas Tabelas numeradas de 01 a 09 acompanhados dos seus respectivos Gráficos. Figuras 06 – 14.

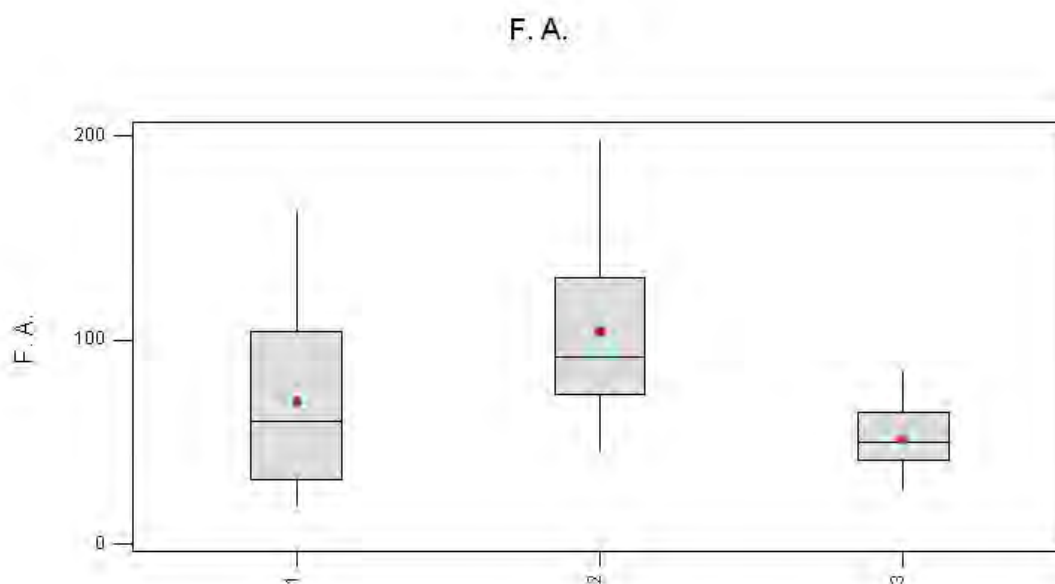
Os valores encontrados para média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados, para cada variável do líquido alantoideano estão representados nas Tabelas numeradas de 10 a 18 acompanhados dos seus respectivos Gráficos. Figuras 15 – 23.

A comparação estatística das médias entre o líquido amniótico e alantoideano dos elementos bioquímicos analisados para cada fase do período gestacional, estão representados na Tabela 19 acompanhada do seu respectivo Gráfico. Figura 24.

TABELA 01. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Fosfatase Alcalina (FA) em U/L no líquido amniótico.

FA – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	69.62 ^a	104.23 ^b	51.46 ^a
Desvio Padrão	44.40	44.71	15.40
Mínimo	19.40	45.40	26.70
Máximo	162.80	197.90	84.20
Amplitude dos dados	143.40	152.50	57.50

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

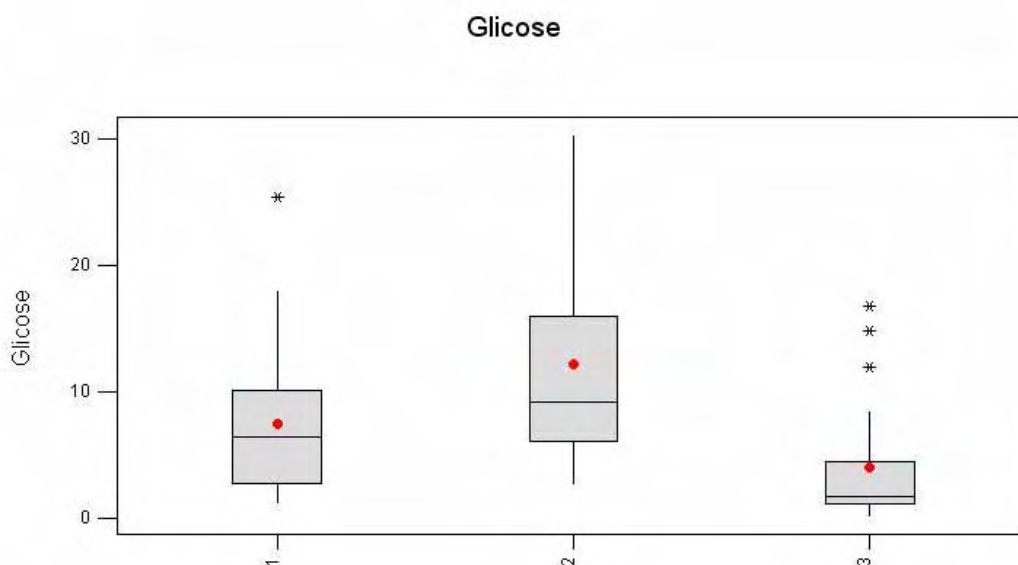
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 06. Representa o gráfico para a Fosfatase Alcalina em U/L no líquido amniótico.

TABELA 02. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da glicose em mg/dL no líquido amniótico.

Glicose – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	7,51 ^a	12,26 ^a	4,01 ^b
Desvio Padrão	6,06	8,59	4,94
Mínimo	1,30	2,70	0,20
Máximo	25,50	30,30	16,80
Amplitude dos dados	24,20	27,60	16,60

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

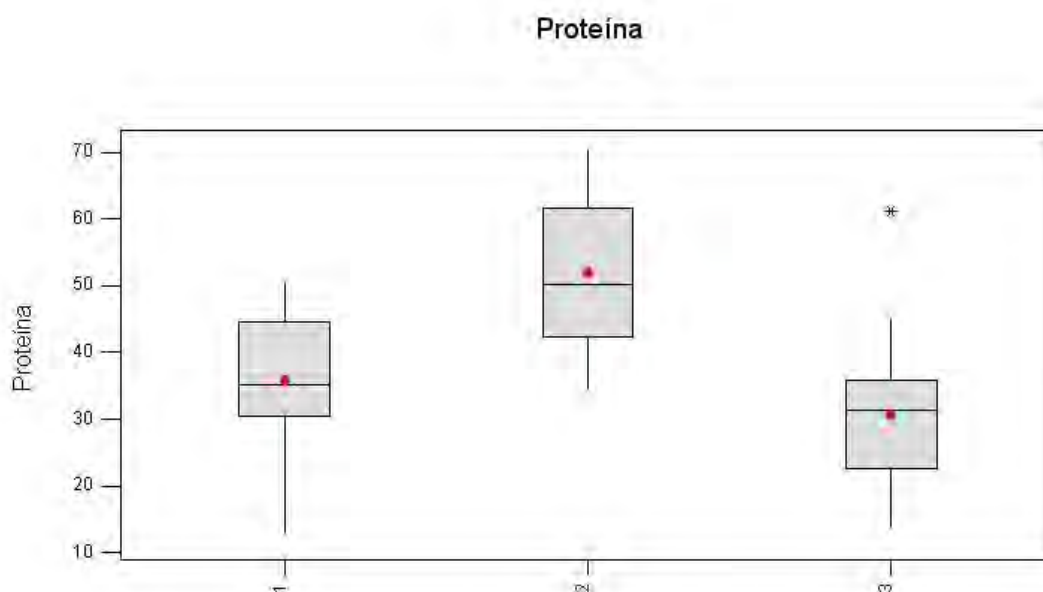
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 07: Representa o gráfico da glicose em mg/dL no líquido amniótico.

TABELA 03. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Proteína Total em mg/dL no líquido amniótico.

PT – Líquido Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	35,78 ^a	51,95 ^b	30,72 ^a
Desvio Padrão	9,79	11,10	10,93
Mínimo	13,00	34,50	13,90
Máximo	50,35	70,50	61,20
Amplitude dos dados	37,35	36,00	47,30

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

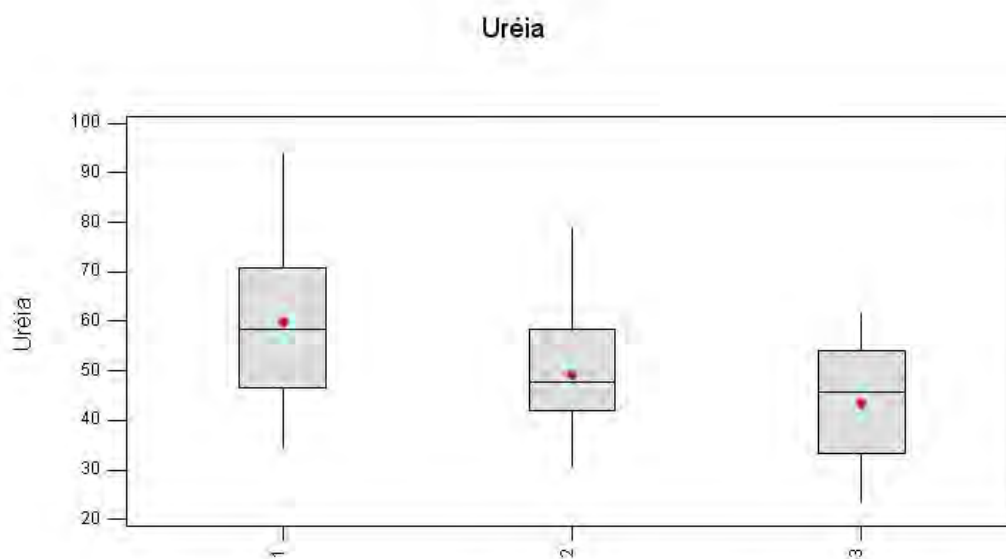
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 08: Representa o gráfico da Proteína Total em mg/dL no líquido amniótico.

TABELA 04. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Uréia em mg/dL no líquido amniótico.

Uréia – Liqui. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	59,99 ^b	49,32 ^a	43,45 ^a
Desvio Padrão	15,71	11,63	11,59
Mínimo	34,50	30,60	23,60
Máximo	93,90	78,90	61,70
Amplitude dos dados	59,40	48,30	38,10

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

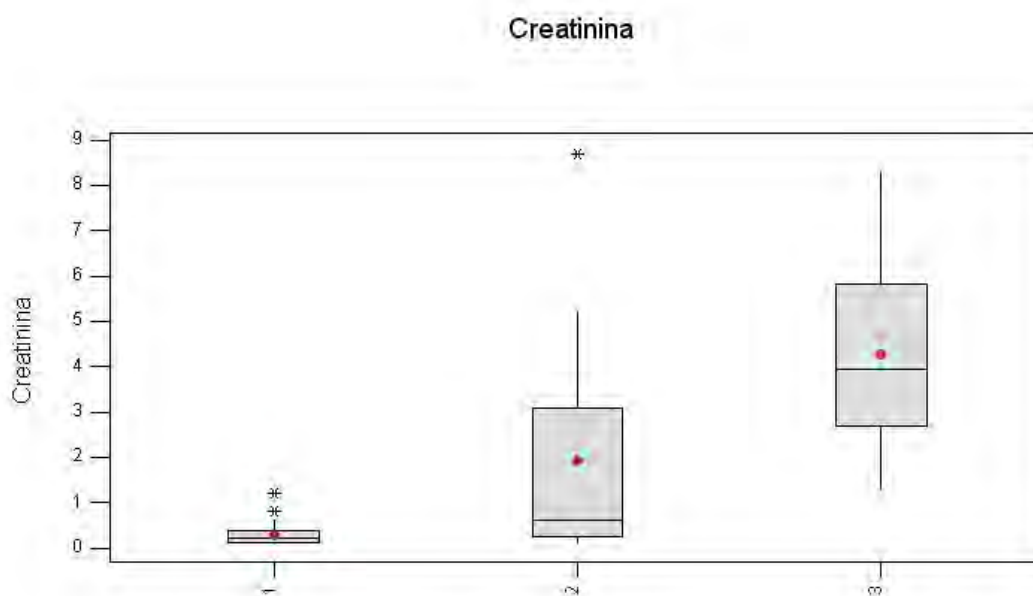
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 09. Representa o gráfico da Uréia em mg/dL no líquido amniótico.

TABELA 05. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Creatinina em mg/dL no líquido amniótico.

Creatinina – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	0,30 ^a	1,93 ^b	4,27 ^c
Desvio Padrão	0,28	2,31	2,12
Mínimo	0,10	0,10	1,30
Máximo	1,20	8,70	8,30
Amplitude dos dados	1,10	8,60	7,00

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

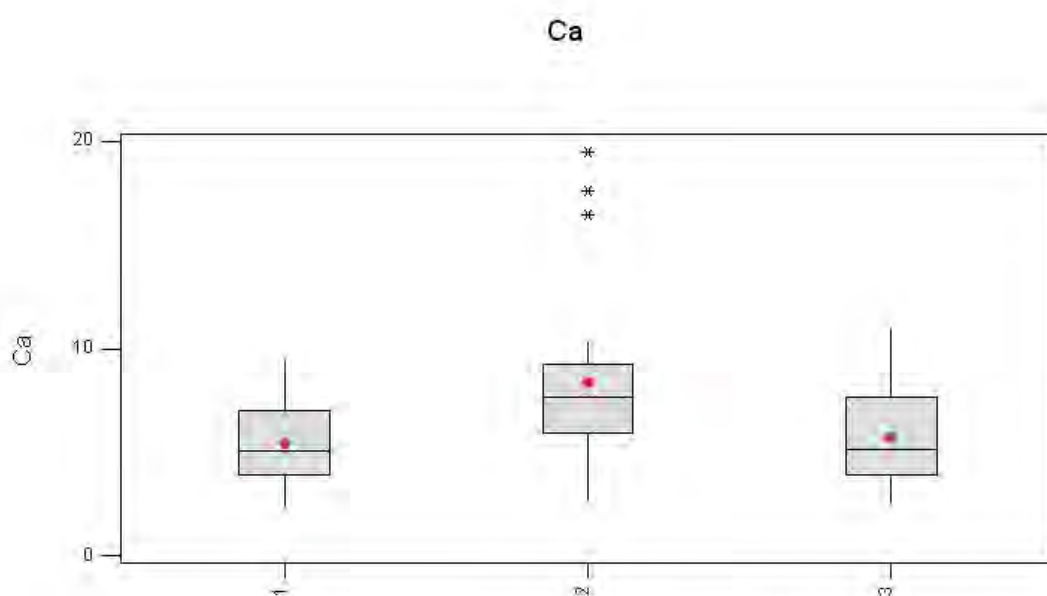
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 10. Representa o gráfico da creatinina em mg/dL no líquido amniótico.

TABELA 06. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do Cálcio em mg/dL no líquido amniótico.

Ca – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	5,43 ^a	8,37 ^b	5,69 ^a
Desvio Padrão	2,07	4,55	2,30
Mínimo	2,40	2,70	2,50
Máximo	9,40	19,50	11,00
Amplitude dos dados	7,00	16,80	8,50

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

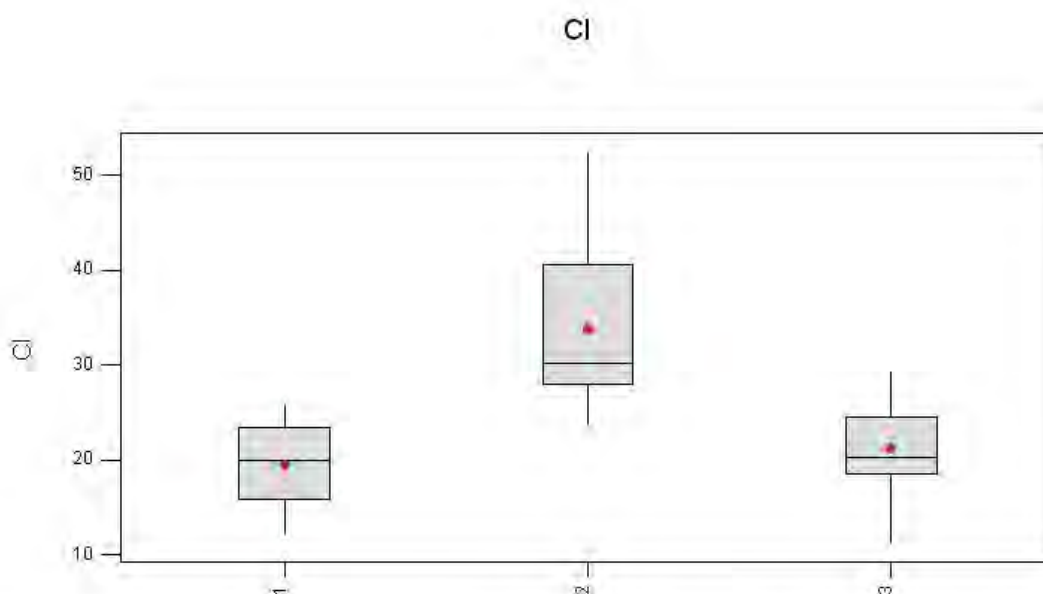
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 11. Representa o gráfico do Cálcio em mg/dL no líquido amniótico.

TABELA 07. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Cloreto em mEq/L no líquido amniótico.

Cl – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	19,54 ^a	33,83 ^b	21,20 ^a
Desvio Padrão	4,42	9,38	4,41
Mínimo	12,15	23,70	11,20
Máximo	25,77	52,50	29,20
Amplitude dos dados	13,62	28,80	18,00

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

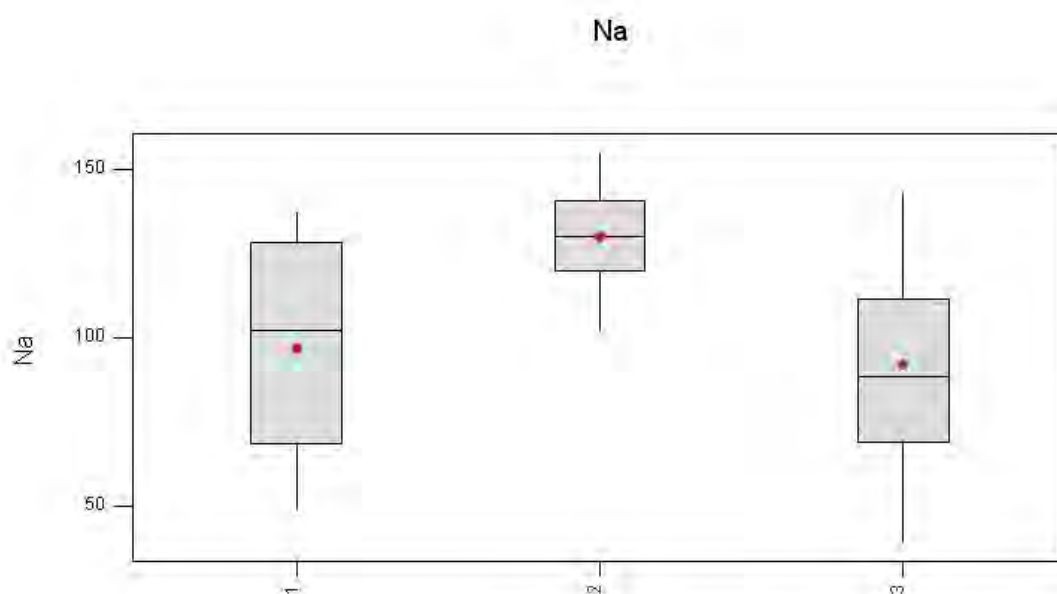
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 12. Representa o gráfico do íon Cálcio em mEq/L no líquido amniótico.

TABELA 08. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Sódio em mEq/L no líquido amniótico.

Na – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	96,95 ^a	130,15 ^b	92,10 ^a
Desvio Padrão	31,20	12,89	26,94
Mínimo	49,00	102,00	39,00
Máximo	137,00	155,00	143,00
Amplitude dos dados	88,00	53,00	104,00

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

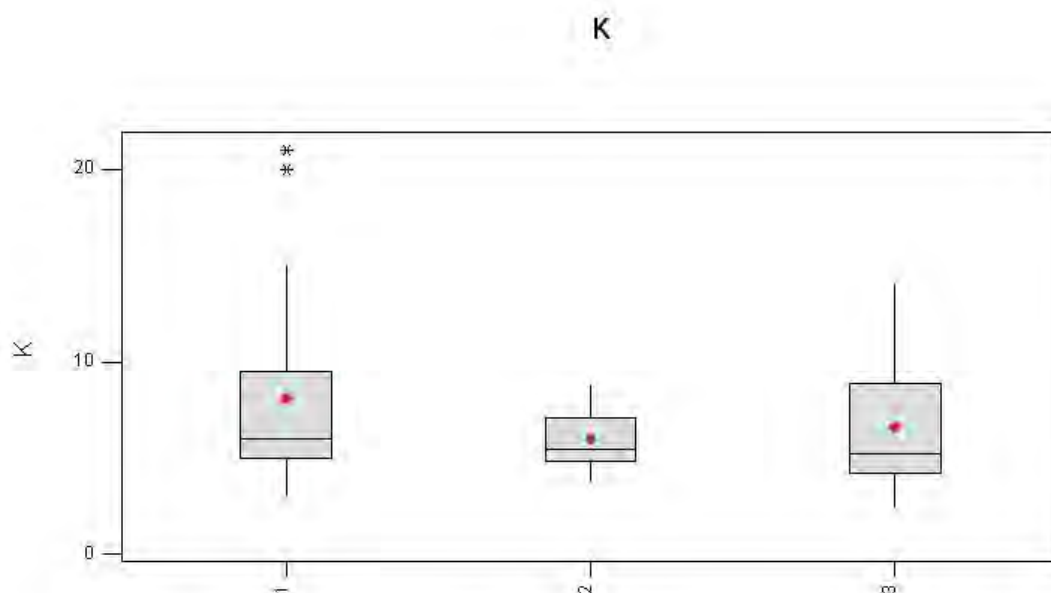
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 13. Representa o gráfico do íon Sódio (Na) em mEq/L no líquido amniótico.

TABELA 09. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Potássio em mEq/L no líquido amniótico.

K – Liq. Amniótico	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	8,10 ^a	5,99 ^a	6,61 ^a
Desvio Padrão	5,19	1,49	3,44
Mínimo	3,00	3,80	2,40
Máximo	21,00	8,80	14,00
Amplitude dos dados	18,00	5,00	11,60

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

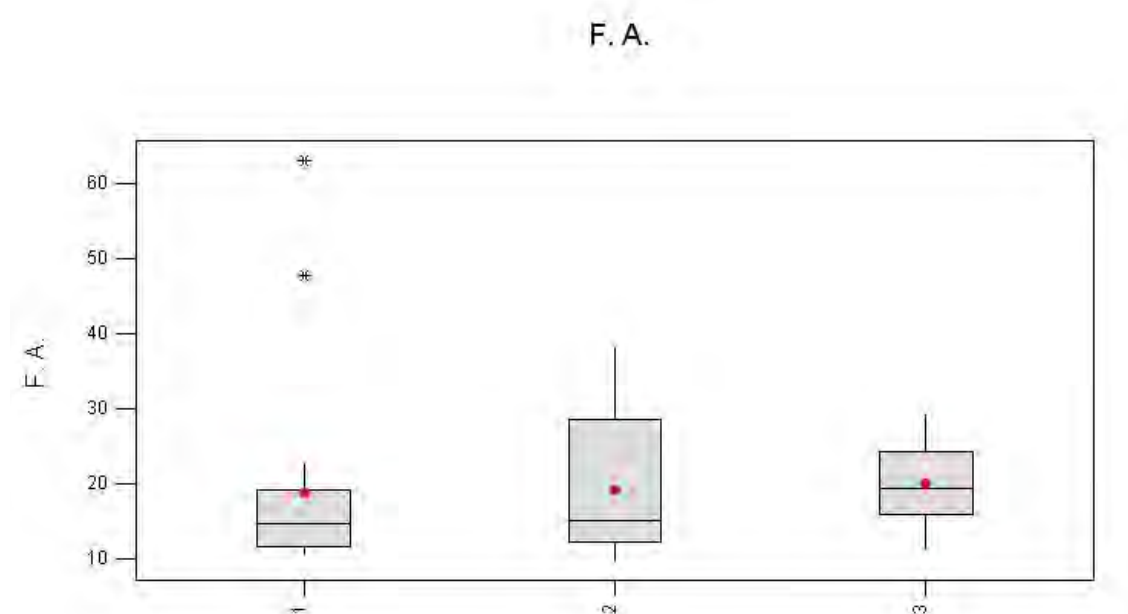
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 14. Representa o gráfico do íon potássio (K) em mEq/L no líquido amniótico.

TABELA 10. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Fosfatase Alcalina em U/L no líquido alantoideano.

FA – Liq. Alantóideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	18,76 ^a	19,21 ^a	19,98 ^a
Desvio Padrão	13,32	9,25	4,79
Mínimo	10,50	9,70	11,30
Máximo	63,20	38,10	29,20
Amplitude dos dados	52,70	28,40	17,90

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

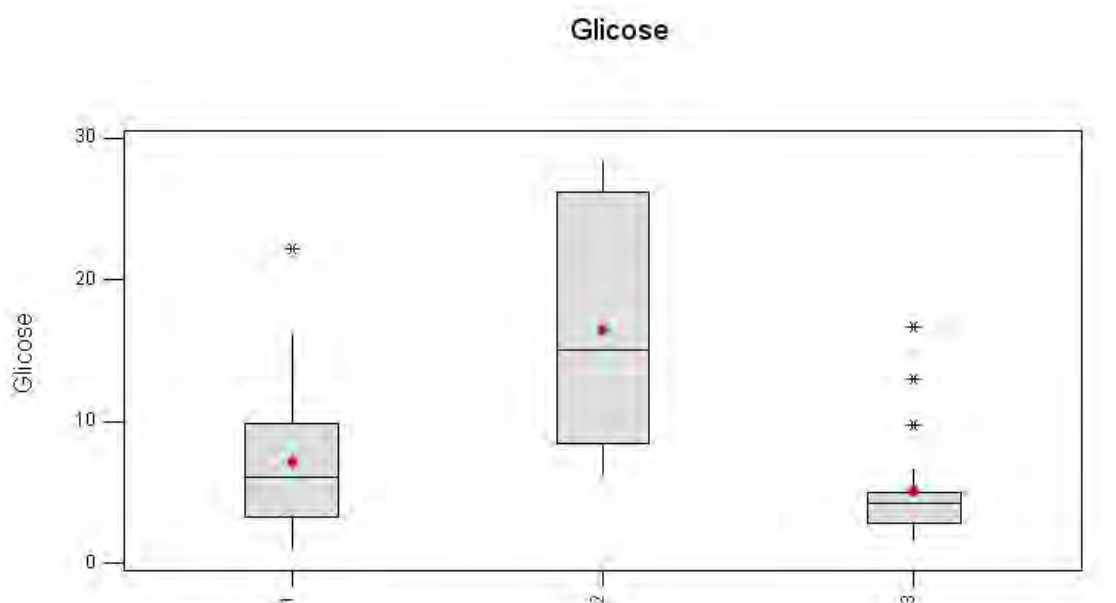
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 15. Representa o gráfico para a Fosfatase alcalina em U/L no líquido alantoideano.

TABELA 11. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da glicose em mg/dL no líquido alantoideano.

Glicose – Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	7,19 ^a	16,43 ^b	5,16 ^a
Desvio Padrão	5,60	8,23	3,84
Mínimo	1,10	6,30	1,60
Máximo	22,20	28,40	16,70
Amplitude dos dados	21,10	22,10	15,10

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

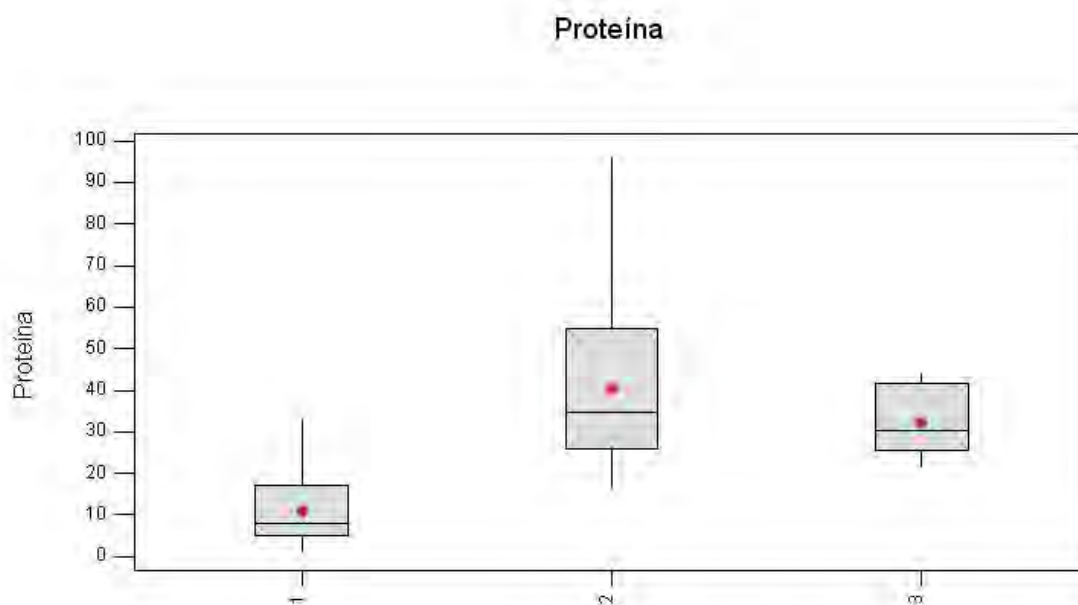
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 16. Representa o gráfico da glicose em mg/dL no líquido alantoideano

TABELA 12. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da proteína total em mg/dL no líquido alantoideano.

PT Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	10,81 ^b	40,53 ^a	32,07 ^a
Desvio Padrão	8,72	19,26	7,94
Mínimo	1,16	16,50	21,30
Máximo	32,65	96,00	44,30
Amplitude dos dados	31,49	79,50	23,00

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

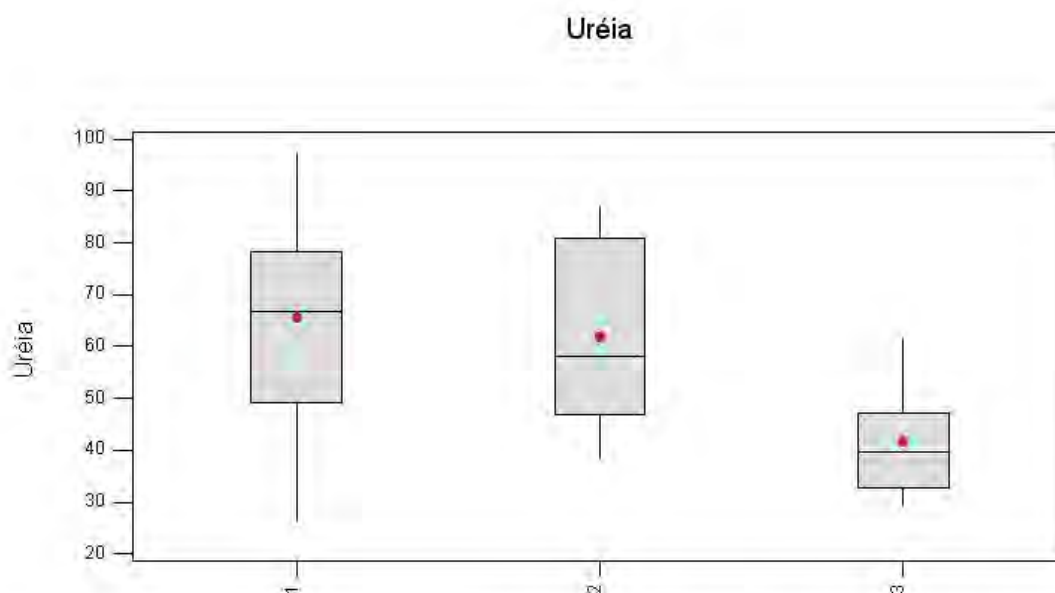
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 17. Representa o gráfico da Proteína Total em mg/dL no líquido alantoideano.

TABELA 13. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Uréia em mg/dL no líquido alantoideano.

Uréia – Líq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	65,74 ^a	61,84 ^a	41,68 ^b
Desvio Padrão	19,78	17,63	9,76
Mínimo	26,40	38,50	29,20
Máximo	97,50	87,00	61,50
Amplitude dos dados	71,10	48,50	32,30

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

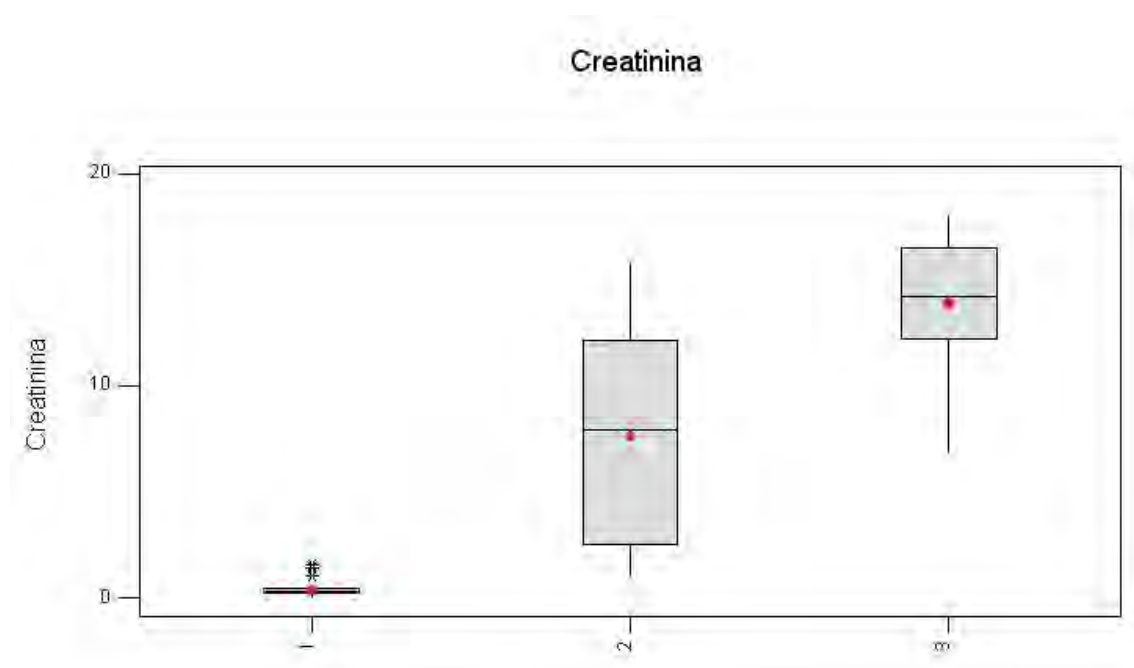
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 18. Representa o gráfico da Uréia em mg/dL no líquido alantoideano.

TABELA 14. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados da Creatinina em mg/dL no líquido alantoideano.

Creatinina – Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	0,41 ^a	7,60 ^b	13,91 ^c
Desvio Padrão	0,42	5,07	3,13
Mínimo	0,00	1,00	6,90
Máximo	1,50	15,80	18,00
Amplitude dos dados	1,50	14,80	11,10

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

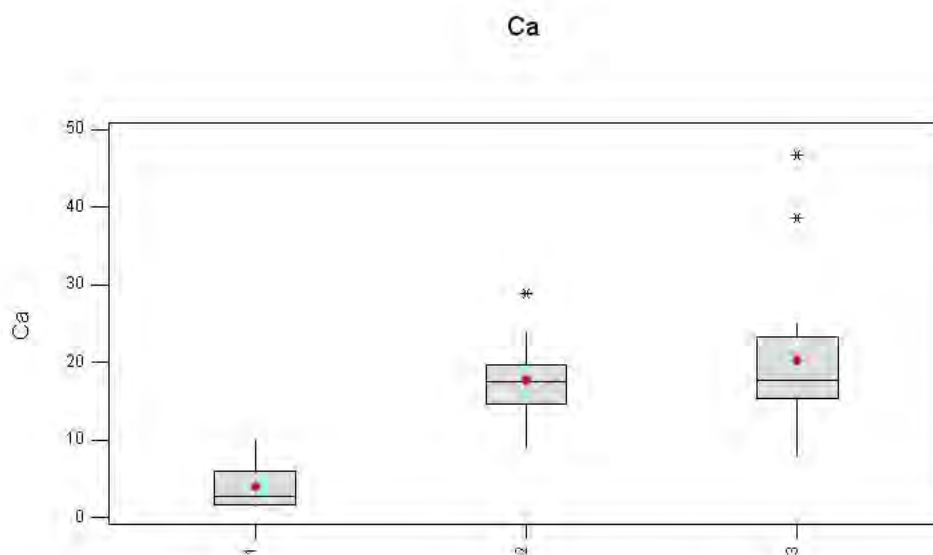
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 19. Representa o gráfico da creatinina em mg/dL no líquido alantoideano.

TABELA 15. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do Cálcio em mg/dL no líquido alantoideano.

Ca – Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	4,12 ^b	17,66 ^a	20,15 ^a
Desvio Padrão	2,98	4,21	8,93
Mínimo	1,40	9,10	8,00
Máximo	10,00	28,80	46,80
Amplitude dos dados	8,60	19,70	38,80

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

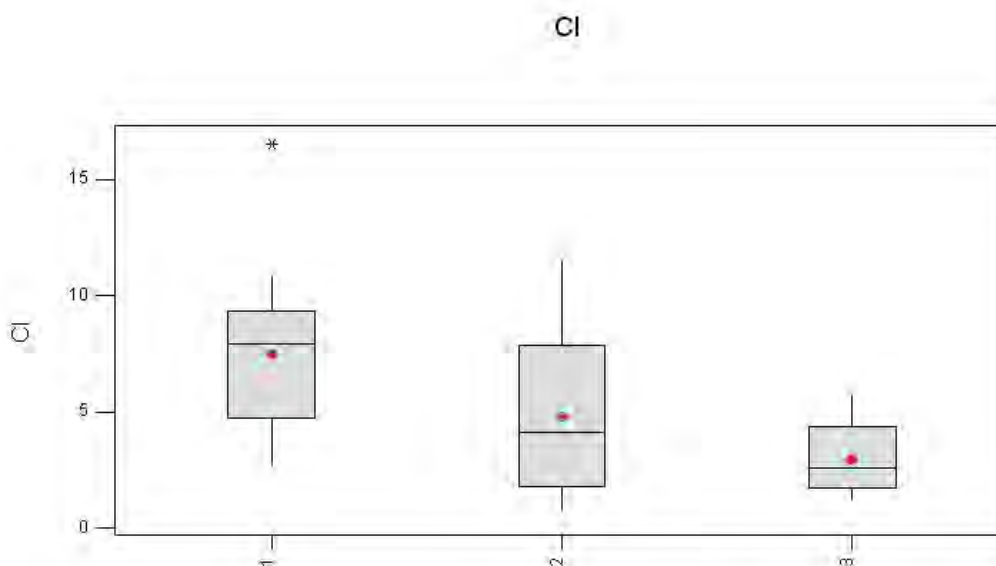
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 20. Representa o gráfico do Cálcio em mg/dL no líquido alantoideano.

TABELA 16. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Cloreto em mEq/L no líquido alantoideano.

Cl – Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	7,54 ^b	4,82 ^a	2,95 ^a
Desvio Padrão	3,29	3,42	1,49
Mínimo	2,68	0,75	1,20
Máximo	16,57	11,50	5,70
Amplitude dos dados	13,89	10,75	4,50

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

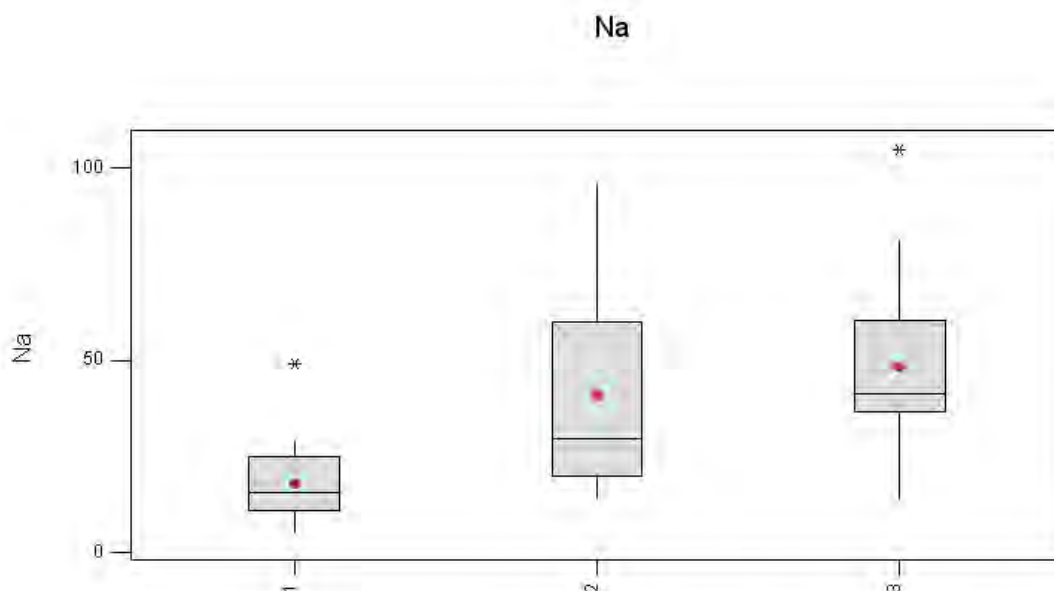
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 21. Representa o gráfico do íon Cloreto em mEq/L no líquido alantoideano.

TABELA 17. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon sódio em mEq/L no líquido alantoideano.

Na – Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	18,15 ^b	41,00 ^a	48,40 ^a
Desvio Padrão	10,39	27,55	21,46
Mínimo	5,00	14,00	14,00
Máximo	49,00	96,00	105,00
Amplitude dos dados	44,00	82,00	91,00

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

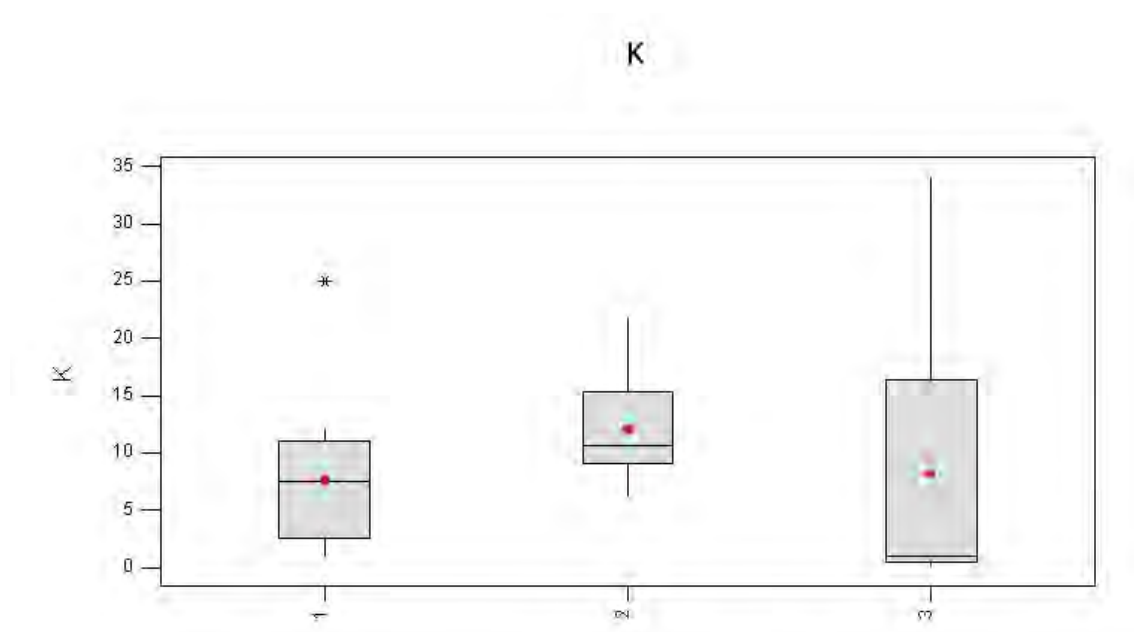
Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 22. Representa o gráfico do íon Sódio em mEq/L no líquido amniótico.

TABELA 18. Expressa os valores da média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e amplitude dos dados do íon Potássio em mEq/L no líquido alantoideano.

K – Liq. Alantoideano	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
Média	7,60 ^a	12,09 ^b	8,13 ^a
Desvio Padrão	5,61	4,32	10,52
Mínimo	1,00	6,20	0,00
Máximo	25,00	21,80	34,20
Amplitude dos dados	24,00	15,60	34,20

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa $p < 0,05$.



1- Terço inicial da gestação.

2- Terço médio da gestação.

3- Terço final da gestação.

Ponto vermelho indica o valor da média.

Traço dentro da caixa revela o valor da mediana.

Asterisco revela valores com perfis anormais.

FIGURA 23. Representa o gráfico do íon Potássio em mEq/L no líquido alantoideano.

TABELA 19. Expressa os valores das médias obtidas da comparação estatística entre o líquido amniótico e alantoideano dos elementos bioquímicos analisados para cada fase do período gestacional.

Variáveis bioquímicas analisadas/fase da gestação	Líquido Alantóide (Valores Médios)	Líquido Amniótico (Valores Médios)
FA – Terço Inicial	18,76 ^{aA}	69,62 ^{aB}
FA – Terço Médio	19,21 ^{aA}	104,23 ^{bB}
FA – Terço Final	19,98 ^{aA}	51,46 ^{aB}
FA – Valor Médio da Gestação	19,31 ^A	75,10 ^B
Glicose – Terço Inicial	7,19 ^{aA}	7,51 ^{aA}
Glicose – Terço Médio	16,43 ^{bA}	12,26 ^{aA}
Glicose – Terço Final	5,16 ^{aA}	4,01 ^{bB}
Glicose – Valor Médio da Gestação	9,59 ^A	7,92 ^A
Proteína – Terço Inicial	10,81 ^{bA}	35,78 ^{aB}
Proteína – Terço Médio	40,53 ^{aA}	51,95 ^{bB}
Proteína – Terço Final	32,07 ^{aA}	30,72 ^{aA}
Proteína – Valor Médio da Gestação	27,80 ^A	39,48 ^B
Uréia – Terço Inicial	65,74 ^{aA}	59,99 ^{bA}
Uréia – Terço Médio	61,84 ^{aA}	49,32 ^{aB}
Uréia – Terço Final	41,68 ^{bA}	43,45 ^{aA}
Uréia – Valor Médio da Gestação	56,42 ^A	50,92 ^A
Creatinina – Terço Inicial	0,41 ^{aA}	0,30 ^{aA}
Creatinina – Terço Médio	7,60 ^{bA}	1,93 ^{bB}
Creatinina – Terço Final	13,91 ^{cA}	4,27 ^{cB}
Creatinina – Valor Médio da Gestação	7,30 ^A	2,16 ^B
Ca – Terço Inicial	4,12 ^{bA}	5,43 ^{aA}
Ca – Terço Médio	17,66 ^{aA}	8,37 ^{bB}
Ca – Terço Final	20,15 ^{aA}	5,69 ^{aB}
Ca – Valor Médio da Gestação	13,97 ^A	6,50 ^B
Cl – Terço Inicial	7,54 ^{bA}	19,54 ^{aB}
Cl – Terço Médio	4,82 ^{aA}	33,83 ^{bB}
Cl – Terço Final	2,95 ^{aA}	21,20 ^{aB}
Cl – Valor Médio da Gestação	5,10 ^A	24,86 ^B
Na – Terço Inicial	18,15 ^{bA}	96,95 ^{aB}
Na – Terço Médio	41,00 ^{aA}	130,15 ^{bB}
Na – Terço Final	48,40 ^{aA}	92,10 ^{aB}
Na – Valor Médio da Gestação	35,85 ^A	106,40 ^B
K – Terço Inicial	7,60 ^{aA}	8,10 ^{aA}
K – Terço Médio	12,09 ^{bA}	5,99 ^{aB}
K – Terço Final	8,13 ^{aA}	6,61 ^{aA}
K – Valor Médio da Gestação	9,27 ^A	6,90 ^B

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$) e letras minúsculas diferentes na mesma coluna, considerando a mesma variável, indicam haver diferença significativa ($p < 0,05$).

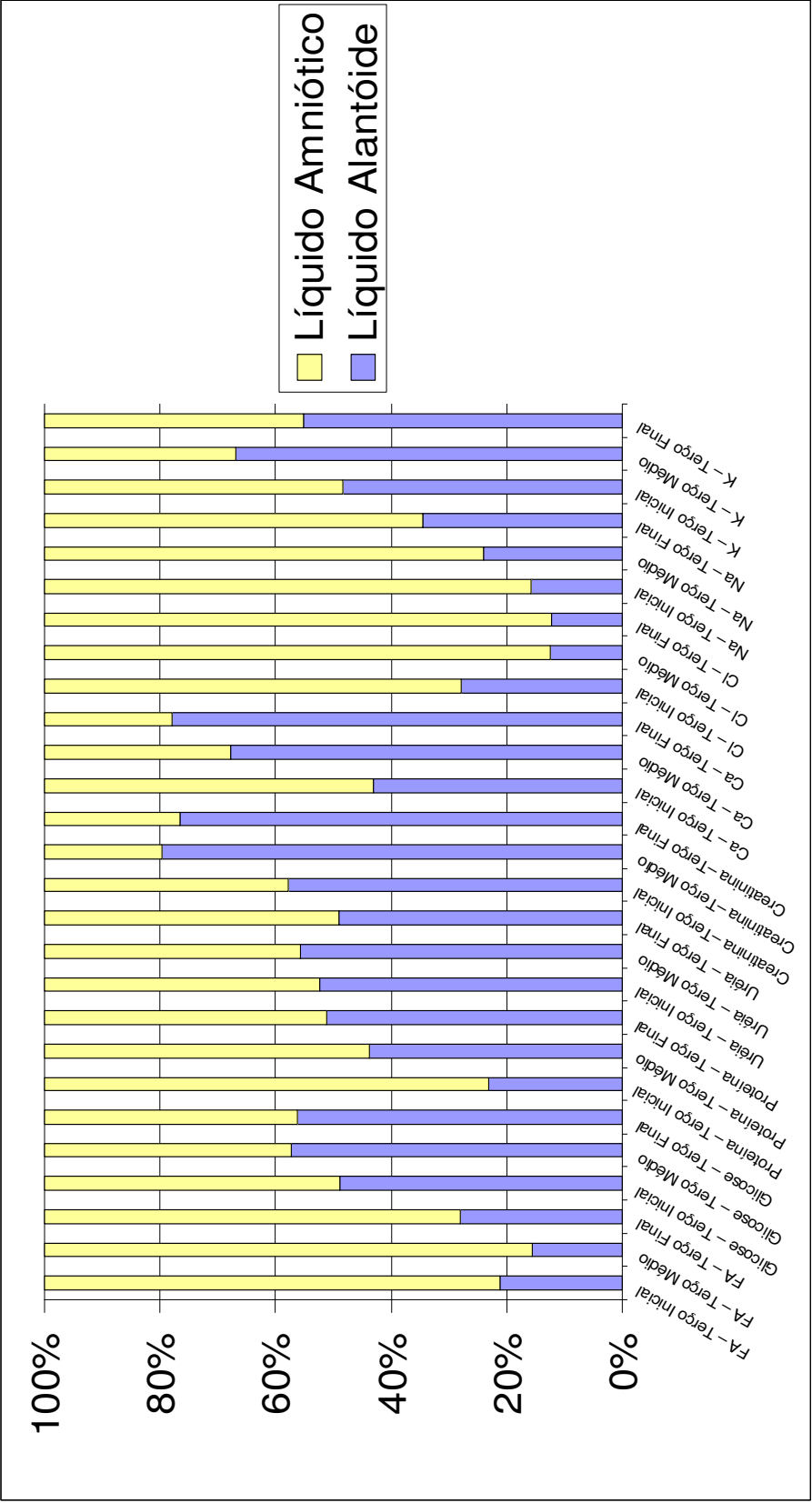
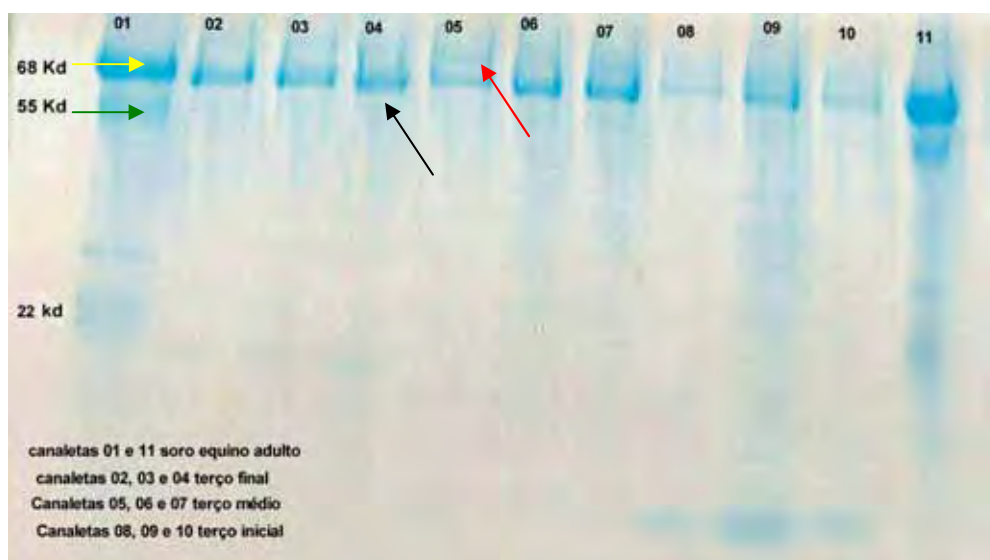


FIGURA 24. Representa o gráfico obtido da comparação da análise bioquímica do líquido amniótico e alantoideano, para cada fase do período gestacional.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% dos líquidos amnióticos apresentou uma banda protéica acima da banda referente à albumina e, revelou a presença de uma banda protéica, imediatamente abaixo da banda da albumina, ambas são visualmente detectáveis, a partir do terço médio da gestação como mostra a Figura 25 da página 41.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% dos líquidos alantoideanos não revelou a presença de bandas protéicas próximas a banda da albumina, para as três fases do período gestacional determinadas para este experimento.



A seta amarela aponta para a banda proteica da albumina.

A seta verde evidencia a banda proteica referente à cadeia pesada de anticorpos.

A seta preta destaca a banda protéica abaixo da banda da albumina e a seta vermelha destaca a banda proteica acima da banda da albumina.

FIGURA 25: Foto da eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% mostrando as bandas protéicas dos líquidos amnióticos.

6. Discussão

Ao consultarmos a literatura, chama à atenção a escassez de trabalhos a respeito da fisiologia obstétrica e, principalmente, sobre a composição bioquímica dos líquidos amnióticos e alantoideanos nos eqüinos, embora, se encontre diversos trabalhos voltados para a assistência ao parto da égua e sobre o diagnóstico da gestação nesta espécie.

Um dos principais empecilhos para o desenvolvimento da fisiologia obstétrica nos eqüinos foi sem dúvida, a dificuldade de se obter com relativa segurança os fluídos amnióticos e alantoideano nas éguas, fato que não ocorreu no ser humano e em outras espécies animais como os ovinos, caprinos e até mesmo, os bovinos. Contudo, a amniocentese na égua durante muitos anos desencadearam problemas como infecções uterinas que inviabilizava a continuidade da vida intra-uterina do concepto e até mesmo, a ocorrência de abortamentos em virtude de traumas decorrentes de varias perfurações da cavidade alantoideana e amniótica para a obtenção dos fluidos fetais (ASBURY, LEBLANC, 1993).

O advento da ultrassonografia permitiu acompanhar o posicionamento do cateter durante a realização do procedimento cirúrgico de laparocentese trans-abdominal (RENAUDIN et al., 1997; VINCE et al., 2002). Este fato trouxe grandes avanços para o procedimento (SCHIMIDT et al., 1991) somados ao desenvolvimento de novos materiais para a confecção de sondas destinadas a cateterizar órgãos delicados como os rins dos humanos, (MURCHIE et al., 2003; LYLE et al., 2006). Muito embora, pelo fato do custo dos equipamentos ser elevado inviabiliza a realização do procedimento, na rotina obstétrica da maioria dos hospitais veterinários.

Diante desse fato, optou-se por trabalhar com peças oriundas de abatedouro especializado no comercio da carne eqüina, para a obtenção dos fluidos fetais. Com isso, o custo financeiro para a realização do experimento tornou-se bem menor, o que permitiu a sua realização.

A colheita dos fluidos fetais, das bolsas amnióticas e alantoideanas dos fetos que se encontravam com 03 meses ou mais de idade gestacional transcorreram sem problemas. Haja vista, a grande quantidade de volume dos fluidos. No entanto, o mesmo não aconteceu para os fetos com idade

gestacional abaixo de 03 meses, pois o reduzido volume das amostras colhidas durante o experimento, dificultou as mensurações propostas. O volume médio obtido para este grupo foi de 2 mL.

Foram colhidos um total de 60 amostras de líquido alantoideano e amniótico, sendo 20 para gestações com idades iguais ou menores que 03 meses, 20 para gestações entre 4 – 8 meses e 20 para gestações com idade maiores ou iguais a 9 meses e respectivamente classificados como grupo 1, 2 e 3.

Os valores das médias encontradas para a fosfatase alcalina FA no líquido amniótico revelaram a ocorrência de um aumento significativo no terço médio da gestação. Assim, para os valores das médias entre o terço inicial e terço médio obteve-se $p = 0,003$ e para o terço médio e final obteve-se $p = 0,004$. No entanto, entre o terço inicial e final não houve variações estatísticas significantes $p = 0,254$. No entanto, os valores das médias da FA no líquido alantoideano não sofreram variações significativas ao longo do período gestacional $p > 0,05$.

Todavia, não foi possível comparar esses resultados com os de outros autores devido à escassez de trabalhos, sobre esse tema na literatura. Porém, os valores da FA no líquido amniótico se apresentaram bem mais elevados nos três momentos do experimento quando comparados aos observados para o líquido alantoideano. Assim, os resultados estatísticos são parecidos aos observados por KOCHHAR et al., (1997) para a espécie eqüina. Embora os valores das médias dos dois trabalhos sejam diferentes. No presente estudo para o terço final da gestação no líquido amniótico ela foi de 51,46 U/L resultado bem inferior ao relatado pelo outro autor que foi de 96,95U/L. Para o fluido alantoideano o presente estudo encontrou a média de 19,98 U/L enquanto o outro autor observou a média de 25,63U/L. Agora ao se comparar as médias da FA entre os dois fluidos evidenciou-se o que a FA se encontra em maior quantidade no líquido amniótico, com diferenças significantes para os três estágios da gestação. A FA está correlacionada com a maturidade fetal, formação óssea fetal e principalmente, com a função renal. Nos estágios iniciais, da gestação em humanos, acredita-se que o aumento da sua intensidade está ligado a descamação do epitélio intestinal (HAHNEMANN, 1974).

No presente estudo, os valores das médias para a glicose no líquido amniótico, no terço final da gestação, apresentou um valor significativamente menor. Portanto, quando se compara os valores dos terços iniciais e médio não se observa diferenças estatísticas. No entanto, entre o terço inicial e final há diferenças significantes $p = 0,254$. O mesmo ocorre entre o terço médio e o final $p = 0,0001$. Para o líquido alantoideano a glicose apresentou um aumento significativo no terço médio da gestação. Assim, evidenciam-se diferenças estatísticas entre o terço inicial e médio, $p = 0,003$ e, entre o terço médio e o final, $p = 0,001$. Agora quando se compara as médias da glicose do líquido alantoideano com as médias do líquido amniótico observa-se que a quantidade de glicose presente no líquido alantoideano é maior e possui significância para o terço final da gestação. Estes resultados são contrários aos relatados por KOCHHAR et al., (1997) que encontraram valores mais altos para o líquido amniótico. Assim, ao se comparar os resultados dos dois trabalhos nota-se que os valores das médias do líquido alantoideano são bastante semelhantes. Já os valores encontrados para o líquido amniótico são diferentes sendo 4,01mg/dL para o presente experimento e 20,1mg/dL para os resultados do outro autor, no terço final da gestação.

Ademais, cumpre lembrar que as éguas eram abatidas nas primeiras horas da manhã e as amostras foram congeladas no período da tarde portanto, transcorreu certo tempo após a morte dos animais e o congelamento das amostras, e este fato pode sim vir a interferir nos resultados das dosagens obtidas neste experimento, em virtude da glicólise que continua a ocorrer mesmo após a morte dos animais.

Outro fator que certamente influenciou os resultados das dosagens da glicose neste experimento é o stress que os animais são submetidos imediatamente antes do abate.

Em ovinos PRESTES et al., (2001) encontraram valores diferentes estatisticamente para a glicose ao compararem a quantidade presente no líquido amniótico aos 70, 100, e 145 dias de gestação. Os autores relatam também, que houve uma redução dos valores ao longo do período gestacional na ovelha. Fato que se assemelha ao observado neste experimento e que provavelmente se deve a ingestão de glicose decorrente do reflexo de deglutição fetal. Ademais, a concentração de glicose pode se apresentar de

maneira diferente entre as espécies pois, BARRETO et al., (2006) dosou a glicose nos fluidos fetais de cadelas aos 30 e 40 dias de gestação e não encontrou variações dos valores entre o líquido alantoideano e amniótico.

As médias encontradas para a proteína total no líquido amniótico durante este experimento, revelam que houve um aumento significativo no terço médio da gestação. Portanto entre o terço inicial e médio há diferenças significativas $p < 0,01$. Entre o terço inicial e final não há diferenças $p > 0,05$ e, entre os o terço médio e final há diferenças significativas, $p < 0,01$. No líquido alantoideano, os valores encontrados revelam um aumento no terço médio da gestação o qual permaneceu até o terço final. Contudo, os valores encontrados neste estudo, em questão, para o líquido alantoideano são muito diferentes daqueles resultados obtidos por KOCHHAR et al., (1997) para o terço final da gestação, sendo que o mesmo fato se repete para a PT presente no líquido amniótico. Ao se comparar os valores entre os fluidos fetais observa-se maiores quantidades de PT no líquido amniótico para o terço inicial e médio. Já para o terço final os valores das médias se equivalem.

No entanto o comportamento dos valores das médias da PT no líquido amniótico ao longo da gestação não foi semelhante ao observado por Prestes et al., (2001) para a espécie ovina. Onde a PT se elevou aos 100 dias de gestação e permaneceu praticamente constante. Não obstante, os valores encontrados neste experimento se assemelham aos obtidos em outras espécies no que tange a pequena quantidade de proteína presente nos fluidos fetais (REDDY et al., 1995; PRESTES et al., 2001; BARRETO et al., 2006). Pois, para se poder analisar a PT neste experimento, houve a necessidade de se empregar o método colorimétrico (Bradford modificado) que é capaz de detectar quantidade mínima de proteína. Uma vez que, o kit empregado para se avaliar a PT na rotina, não foi sensível, o bastante, para se dosar as proteínas presentes nos líquidos fetais da égua.

A média dos valores para a uréia no líquido amniótico apresentou um valor mais elevado e significativo, segundo os cálculos estatísticos, na fase inicial da gestação $p < 0,05$. O mesmo fato foi observado no líquido amniótico de ovinos por PRESTES et al., (2001). Posteriormente, para o terço médio e final os valores não sofreram alterações. O valor da média no presente estudo, para o terço final da gestação foi de 43,45 mg/dL resultado muito semelhante ao

encontrado por KOCHHAR et al., (1997), que relataram um valor de 41,7 mg/dL para o líquido amniótico de éguas que não apresentaram partos distócicos.

A média dos valores da uréia no líquido alantoideano revelaram não haver diferenças de valores entre o terço inicial e médio da gestação $p = 0,624$. Porém, ocorreu uma diminuição do valor no terço final da gestação onde $p < 0,005$. Tal fato pode ser decorrente da grande quantidade de urina presente no saco alantoideano no terço final da gestação (MELLOR et al., 1975). A média obtida neste trabalho para a uréia no terço final de gestação foi de 41,68 mg/dL valor próximo ao encontrado por KOCHHAR et al., (1997) que foi de $27,75 \pm 9,48$ mg/dL. Contudo, quando comparamos os valores da uréia no líquido amniótico e alantoideano observou-se que os valores foram diferentes apenas no terço médio da gestação onde a média do líquido alantoideano se apresentou mais elevada. Esse resultado difere dos observados por BARRETO et al., (2006) em cadelas, ao dosar a uréia entre 30 e 40 dias de gestação. Pois, esses autores não encontraram diferenças estatísticas entre o líquido alantoideano e amniótico.

A média dos valores da creatinina presente no líquido amniótico se elevou ao longo do período gestacional. Os valores apresentaram diferenças significativas entre o terço inicial e o médio $p = 0,004$ e, entre o terço médio e o terço final $p = 0,003$. No entanto, os valores obtidos para a creatinina no terço final de gestação, neste experimento foi de 4,27mg/dL valor bem menor que os relatados por KOCHHAR et al., (1997) que foi de $19,38 \pm 4,67$ mg/dL. Para o líquido alantoideano o valor observado também apresentou variações significantes ao longo da gestação. Os valores apresentaram diferenças significativas entre o terço inicial e o médio $p = 0,001$ e, entre o terço médio e o terço final $p = 0,01$. Entretanto, o valor observado de 13,91mg/dL é muito inferior aos obtido por KOCHHAR et al., (1997) que foi de 68,7mg/dL. Ao compararmos os valores entre os líquidos amnióticos e alantoideanos observa-se valores estatisticamente diferentes para o terço médio e final da gestação, sendo os valores presentes no líquido alantoideano superior ao do líquido amniótico. Essa observação no presente trabalho está em conformidade com o resultados encontrados por KOCHHAR et al., (1997). O aumento da taxa de creatinina está correlacionado com a maturidade renal (PRESTES et al., 2001) e também; com a atividade muscular fetal (KOCHHAR et al., 1997). E segundo

VAALA, (1999) os fetos eqüinos que são acometidos pela síndrome da asfíxia no pré-parto apresentam alteração do valor da creatinina em função da redução do fluxo sanguíneo destinado a perfusão renal. Porém, essa observação da diferença dos valores entre os fluidos fetais para a creatinina não foi observado nas cadelas por BARRETO et al., (2006).

A média do íon cálcio do líquido amniótico, no terço médio da gestação foi de 8,37mg/dL apresentando uma elevação significativa quando comparada com o terço inicial $p = 0,01$ e final da gestação $p = 0,04$. Para o líquido alantoideano, o íon cálcio apresentou uma elevação ao longo da gestação, sendo que a média obtida no terço inicial foi de 4,12mg/dL mais baixa e estatisticamente diferente das médias observadas para o terço médio que foi de 17,66 mg/dL e também, para o terço final que foi de 20,15mg/dL onde $p = 0,001$. Todavia, ao se comparar os valores obtidos entre os líquidos fetais observa-se que no terço inicial da gestação os valores são semelhantes enquanto que para o terço médio e final há diferenças estatísticas significantes e a quantidade de íon cálcio se apresenta mais elevada no líquido alantoideano. Esses resultados se assemelham aos obtidos por KOCHHAR et al., (1997) porém a unidade utilizada por esses autores foi mEq/L. Os mesmos autores atribuem a maior concentração de íons Cálcio no líquido alantoideano a atividade renal. Ademais, faltam trabalhos sobre o assunto para se estabelecer novas comparações.

A média da concentração do íon cloreto (Cl) no líquido amniótico no terço médio do período gestacional foi de 33,83mEq/L, se apresentando mais alta e estatisticamente diferente das médias obtidas no terço inicial e final da gestação. Este fato não foi observado por PRESTES et al., (2001) em líquido amniótico de ovelhas. Onde os autores encontraram valores estatisticamente diferentes no decorrer da gestação. No líquido alantoideano houve uma redução significativa estatisticamente da concentração do íon Cl do terço inicial para o terço médio. Este valor permaneceu sem sofrer alteração significativa, entre este momento e o terço final da gestação. Não obstante, ao se comparar os valores de Cl encontrados no líquido alantoideano e amniótico evidencia-se uma concentração mais elevada e, estatisticamente significativa, no líquido amniótico. Isto se fez presente nos três períodos do experimento.

A média da concentração do íon sódio (Na) no líquido amniótico se apresentou mais alta no terço médio 130,15mEq/L. Ela é estatisticamente significativa quando comparada ao terço inicial e final. A concentração encontrada no terço final foi de 92,10 mEq/L. Esse valor é menor ao observado por KOCHHAR et al., (1997). Porém esse fato não foi observado por PRESTES et al., (2001) em ovinos, que encontraram uma redução significativa da concentração de Na ao longo da gestação. No líquido alantoideano as médias da concentração de Cl não sofreram variações significativas durante a gestação. Entretanto, ao se comparar os valores da concentração deste íon presente no líquido alantoideano e amniótico observa-se que a concentração é mais alta e significativa no líquido amniótico, nos três momentos gestacionais determinados para a realização do experimento. Sendo que a maior diferença se deu no terço médio da gestação. Esse resultado não se assemelha ao observado por BARRETO et al., (2006) em cadelas.

As médias da concentração de potássio K não sofreram variações significativas no líquido amniótico ao longo do período gestacional. Para o terço final da gestação a média encontrada foi de 6,61mEq/L. Esse valor está bem próximo ao observado por KOCHHAR et al., (1997) que encontraram uma concentração de 9,2mEq/L. Para o líquido alantoideano a média da concentração do K foi de 12,09 mEq/L se apresentando mais elevada e estatisticamente diferente no terço médio. Para o terço final a concentração de K foi de 8,13mEq/L valor também bastante próximo dos encontrados por KOCHHAR et al., (1997). Outrossim ao se comparar as médias das concentrações do K presente nos líquidos fetais observa-se que no terço médio a concentração é maior e, significativa no líquido alantoide. Isso está relacionado com o aumento da produção da urina fetal mas também, com o aumento da atividade metabólica do feto durante a gestação (KOCHHAR et al., 1997; PRESTES et al., 2001).

Não foi possível de se realizar a dosagem do Lactato desidrogenase (LDH) empregando-se o método cinético para determinação no plasma ou soro. A técnica baseia-se na conversão do piruvato pela LDH em lactato, transformando o NADH₂ em NAD. Os resultados obtidos foram muito dispares. Tentou-se então, utilizar um kit de outra marca. Porém, sem sucesso e, para se verificar se os kits estavam sem problemas, dosou-se a LDH de um cão. O

resultado obtido estava dentro dos padrões de normalidade. No entanto KOCHHAR et al., (1997) em seu trabalho relata a dosagem de LDH Entretanto, o autor não menciona a técnica empregada.

A corrida eletroforética foi realizada empregando-se a solução de gel de separação a 12% seguindo a metodologia preconizada por BARRETO (2006) para a eletroforese do líquido amniótico de cadelas. Ademais, foi nessa concentração que se conseguiu uma melhor distribuição e consequentemente, melhor visualização das bandas protéicas, pois quando se aumentou a concentração do gel de separação para 15% a corrida de proteínas praticamente não ocorreu e, ao se diminuir as concentrações para 10% e 8% não ocorriam às separações das bandas protéicas ao longo do gel.

A eletroforese para a observação da AFP foi realizada utilizando-se 07 amostras de líquidos amnióticos de éguas em terço inicial de gestação, 07 amostras de líquidos em terço médio e 07 amostras de líquidos em terço final de gestação. Uma vez que, já se sabe que a albumina bovina possui um peso molecular de 68 kDa LANE, (1985) pode-se estimar o peso da albumina eqüina e, a partir de então, procurou-se identificar se havia a presença de uma banda protéica abaixo da banda de albumina e acima da banda protéica da cadeia pesada de anticorpos, cujo peso molecular é de 55 kDa (LANE, 1985). A alfa-fetoproteína é uma alfa-globulina KANEKO, (1997) cujo peso molecular na espécie humana é de 69 kDa CAMPANA et al., (2003) e na espécie canina é de 66 kDa (BARRETO, 2006).

Em todas as amostras analisadas pode-se visualizar com facilidade a banda protéica referente à albumina. Para as amostras do terço inicial de gestação não se observou a presença de uma banda protéica imediatamente abaixo da banda da albumina em 5 das 7 amostras analisadas. No entanto, para as mostras do terço médio já foi possível, visualizar a presença de uma banda protéica de coloração leve, o que indica baixa concentração de proteína, imediatamente abaixo da banda da albumina. Isso se deu em todas as amostras analisadas. A interpretação da eletroforese das amostras dos líquidos amnióticos do terço final da gestação, revelou a presença de bandas protéicas com coloração mais intensa e portanto, mais fácil de se visualizar que a observada nas amostras do terço médio. Isto indica, um provável aumento da

concentração protéica, no entanto a separação entre as bandas da AFP e albumina são tênues devido à proximidade do peso molecular dessas moléculas. Essas observações parecem ser contrárias as relatadas por SMITH et al., (1979) que através de radioimunoensaio encontraram uma concentração mais elevada de AFP nos fluidos fetais em bovinos, para o terceiro e quarto mês de gestação.

Outro fenômeno que chamou a atenção na eletroforese foi a presença de uma banda protéica imediatamente acima da banda de albumina indicando portanto, que há outra proteína de peso molecular discretamente maior que a albumina para a espécie eqüina no liquido amniótico.

A eletroforese das amostras dos líquidos alantoideanos não permitiu identificar de forma clara a presença de bandas protéicas que de acordo com o seu peso molecular pudessem ser reconhecidas como sendo a AFP. Isso pode estar relacionado com baixas concentrações da AFP nos líquidos alantoideanos pesquisados, a necessidade de ajuste da técnica somado a falta do conhecimento do peso molecular exato da AFP dos eqüinos. Todos esses fatores foram limitantes para a obtenção deste resultado.

7. Conclusões

1) Para o líquido amniótico observa-se que:

- a fosfatase alcalina, a Proteína total, os íons Cálcio, Cloreto e Sódio são mais elevados no terço médio do período gestacional.
- a concentração da uréia é maior na fase inicial da gestação.
- a concentração de creatinina se eleva durante a gestação.
- a concentração do íon Potássio não se eleva durante as fases gestacionais determinadas para este experimento.

2) Para o líquido alantoideano observa-se que:

- a fosfatase alcalina não apresenta variações significantes ao longo do período gestacional.
- a glicose e o íon potássio apresentam aumento no terço médio da gestação
- a proteína total, os íons Cálcio e Sódio apresentam valores menores no terço inicial da gestação.
- a concentração do íon cloreto é menor no início da gestação.
- a concentração da uréia é menor na fase final da gestação
- a concentração do íon cloreto é maior na fase inicial da gestação.
- a concentração da creatinina se elevou durante a gestação.

3) As comparações das médias das concentrações dos líquidos fetais revelam que:

- as concentrações da Fosfatase alcalina, Proteína total, íons cloreto, Sódio, são maiores no líquido amniótico nas três fases da gestação.
- as concentrações da Glicose e da Uréia não apresentam diferenças durante a gestação
- as concentrações dos íons Cálcio, Potássio são maiores no líquido alantoideano.

4) A eletroforese do líquido amniótico possibilitou identificar uma banda protéica imediatamente abaixo da banda referente à banda da albumina,

e uma banda imediatamente acima. Estas bandas protéicas aumentaram de tamanho ao longo do período gestacional o que sugere um aumento da concentração protéica, mas novos estudos precisam ser realizados para se determinar quais destas bandas proteicas é a alfa-fetoproteína equina.

5) Há necessidade de novos trabalhos sobre avaliações bioquímicas dos fluidos fetais na espécie eqüina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGORASTOS, T. Antenatal estimation of fetal maturity by exfoliative cytology of amniotic fluid. **Z. Geburtshilfe Perinatol.**, v. 183, p.118-127, 1979.

ALEXANDER, D.P., NIXON, D.A., WIDDAS, W.F., WOHLZOGEN, F.X. Gestational variations in the composition of the foetal fluids and foetal urine in the sheep. **J. Physiol.** v.140, p.1-13, 1958.

ALVAREZ-NAVA, F., SOTO, M., PADRÓN, T., MORALES, A., VILLALOBOS, D., ATENCIO, A.R., PRIETRO, M., MARTINEZ, M.C. Cribado prenatal sérico materno para la detección da anormalidades cromossômicas fetales: importância clínica de la tasa de falsos positivos. **Invest. Clin.**, v. 44, n.3, p.195-207, 2003.

ARTHUR, G.H. The Fetal fluids of domestic animals. **J. Reprod. Fertil.**, v.9, p.45-52, 1969.

ASBURY, A.C., LeBLANC, M.M. The placenta. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. p.509-516.

BANJANIN, S., KAPOR, A., MATTHEWS, S.G. Prenatal glucocorticoid exposure alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and blood pressure in mature male guinea pigs. **J. Physiol.**, v. 558.1, p. 305-318, 2004.

BARRETO, C.S. Aspectos fisiológicos da maturidade fetal em cães. Tese de Doutorado. FMVZ-UNESP-Campus de Botucatu, 2006, 74p.

BARRETO, C.S., SOUZA, F.F., PRESTES, N.C. Avaliação bioquímica dos fluidos amniótico e alantoideano de cadelas entre 30 a 40 dias de gestação. **Rev. Portuguesa Cienc. Vet.**, v.101, p.215-217, 2006.

BJÖRKMAN, N. Fine structure of the fetal-maternal area of Exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. **Acta Anat.**, v.86, suppl.1, p.1-22, 1973.

BONGSO, T.A., BASRUR, P.K. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. **Vet. Rec.**, v.96, p.124-127, 1975.

BREUKELMAN, S.P., SZENCI, O., BEKERS, J-F., KINDAHL, H., MULDER, E.J.H., JONKER, F.H., WEIJDEN, B. van der, REVY, D., POGANY, K., SULON, J., NÉMEDI, I., TAVERNE, M.A.M. Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F2 α -metabolite (PGF2 α -metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. **Theriogenology**, v.64, p.917-933, 2005.

CAMPANA, S.G., CHÁVEZ, J.H., HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido fetal. **J. Bras. Patologia Med. Labor.** V. 39, p. 215-218, 2003.

CARBONE, B. et al. changes in plasma and amniotic fluid endothelin levels during pregnancy: facts or artifacts. **European journal of obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.76, p.15-19, 1998.

DELAMARRE, F.M.C. et al. Effect of angiotensin infusion on plasma endothelin in pregnancy. **European journal of obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.77, p.33-35, 1998.

ERENO, R.L., MOYA, C.F., PIAGENTINI, M., OBA, E. Concentração plasmática de progesterona e cortisol durante o final da gestação e início do pós-parto de vacas e novilhas Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 17, 2007, Curitiba, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2007, p.10.

FLOOD, P.F. Fertilization, early development, and the establishment of the placenta. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.473-485.

GORDON, E.D., BRACERO, F.M., VARGAS, M.L., DÍAZ, O.C. Evaluación Del programa de diagnóstico prenatal de las malformaciones congênitas por cuantificación de La alfafetoproteína. Camaguey 1985-1998. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.1, p.5-10, 2003.

GRUNERT, E., BIRGEL, E.H. **Obstetrícia veterinária**. 3 ed. Porto Alegre: Editora Sulina; 1989. 323p.

GUINTER, O.G. Equine pregnancy: Physical interaction between the uterus and conceptus. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 44.1998. **Proceedings...** p.73-104.

HAHNEMANN, N., SORENSON, S.A. Studies on alkaline phosphatase in amniotic in fluid. **Acta Obstet. Gynaecol. Scand.**, v.53, p.15-22, 1974.

JONKER, F.H Fetal deaph: comparative in large domestic animals. **An. Repr. Sci.**, v. 82-83 p. 415-430, 2004.

KANEKO, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5 ed., San Diego: Academic Press, 1997, p.117-138.

KOCHHAR, H.P.S., SIMRAN, P.S., NANDA, A.S., KAUR, R. Comparative biochemical indices of fetal fluids in normal foaling and stressful delivery in Indian Thoroughbred. **J. Equine Vet. Sci.**, v.17, n. 4, p.206-210, 1997.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Reconhecimento materno do conceito e início da placentação. In: PRESTES,N.C., LANDIM-AVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. p.22-40.

LANE, H.D. **Antibodies a Laboratory Manual**. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

LEIBO, S.P., RALL, W.F. Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. **Theriogenology**, v.33, p.531-553, 1990.

LEISER, R., KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.102, p.122-134, 1994.

LI, N., WELLS, D.N., PETERSON, A.J., LE, R.S.F. Perturbations in the biochemical composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer pregnancies in the first half of gestation. **Biol. Reprod.**, v.73, p.139-148, 2005.

LINDBERG, A., NISKANEN, R., GUSTAFSSON, H., BENGTSON, B., BAULE, C., BELÁK, S., ALENIUS, S. Prenatal diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection by detection of viral RNA in fetal fluids. **Vet. J.**, v.164, p.151-155, 2002.

LOVELL, K.L., SPRECHER, D.J., AMES, N.K., JONES, M.Z. Development and efficacy of ultrasound-guided fetal fluid aspiration techniques for prenatal diagnosis of caprine β -mannosidosis. **Theriogenology**, v.44, p.517-527, 1995.

LUMBERS, E.R., SMITH, F.G., STEVENS, A.D. Measurement of net transplacental transfer of fluid to the fetal sheep. **J. Physiol.**, v. 364, p.289-99, 1985.

LYLE, S.K., PACCAMONTI, D.L., HUBERT, J.D., SCHLAFFER, D.H., CAUSEY, R.C., EILTS, B.E., JOHNSON, J.R. Laparoscopic placement of an indwelling allantoic catheter in the mare: Biochemical cytologic, histologic, and microbiologic findings. **An. Reprod. Sci.**, v.94, p.428-431, 2006.

MAESTRI, D., SANSAVERINO, M.T.V., CHEINQUER, N., CORREIA, M.C.M., KESSLER, R.G., AZEVEDO MAGALHÃES, J.A. Alfetoproteína: valores

normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v.44, n.4, p.273-276, 1998.

MARTÍNEZ, V., JIMÉNEZ, M., SCHOSINSKY, K. Comparación de La determinación enzimática de fosfolípidos que contienen colina con otras pruebas para evaluar madurez pulmonar fetal. **Rev. Costarric. Cienc. Med.**, v.20, n.1-2, p.51-65, 1999.

McDOUGALL, E.I. The composition of foetal fluids of sheep at different stages of gestation. **Biochim. J.**, v.45, p.397-400, 1949.

MELLOR, D.J., SLATER, J.S. Variation in the distribution of glucose and fructose within chronically catheterized sheep conceptuses during the last two months of pregnancy. **Res. Vet. Sci.**, v.15, p.317-321, 1973.

MOYA, C.F., PRESTES, N.C., PIAGENTINI, M., ROCHA, N.S. Amniotic fluid cytology at parturition from Nelore calves conceived by artificial insemination embryo transfer, or in vitro production. **An. Reprod.**, v.3, p.391-395, 2006.

MURCHIE, T.A., MACPHERSON, M., LeBLANC, M.M., LUZNAR, S., VICKROY, T.W. A microdialysis model to detect drugs in the allantoic fluid of pregnant pony mares. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 49. 2003. **Proceedings...**

PRESTES, N.C. Os líquidos fetais e sua constituição bioquímica. In: PRESTES, N.C., LANDIM-AVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. p.41-51.

PRESTES, N.C., CHALHOUB, M.C.L., LOPES, M.D., TAKAHIRA, R.K. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. **Small Rum. Res.**, v.39, p.277-281, 2001.

QUINN, B. A. HAYES, M. A. WAELCHI, R.O. BETTERIDGE, K.J. Major proteins in the embryonic capsule, and in yolk-sac and uterine fluids, during the

second to fourth weeks of pregnancy in the mare. In: HAVEMEYER FOUNDATION MONOGRAPH SERIES. 16. 2004. **Proceedings...** p.47-49.

RENAUDIN, C. D. *et al.*, Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transretal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. **Theriogenology**, v.47, n. 2, p. 559-573, 1997.

RODRIGUES, V., TONIOLO, G.H., LOPES, J.A., OLIVEIRA, J.A., OLIVEIRA, C.A., PINTO, M.L. Teores séricos do cortisol em cadelas submetidas à cesariana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 17, 2007, Curitiba, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2007, p.30.

SCHIMIDT, A.R. WILIANS, M.A., CARLETON, C.L., DARIEN, B.J., DERKSEN, F.J. Evaluation of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis in the late gestational mare. **Eq. Vet. J.**, 23, n. 4, p 261-165, 1991.

SEPULVEDA, W., DONALDSON, A., JONSON, R.D., DAVIES, G., FISK, N.M. Are routine alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase determinations still necessary at second-trimester amniocentesis? Impact of high-resolution ultrasonography. **Obstet. Gynecol.**, v.83, n.1, p.107-112, 1995.

SMITH, K.M., LAI, P.C., ROBERTSON, H.A., CRURCH, R.B., LORSCHIEDER, F.L. Distribution of alpha 1-fetoprotein in fetal plasma, allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.57, n.1, p.235-238, 1979.

SMITH, K.C., McGLADDERY, A.J., BINNS, M.M., MUMFORD, J.A. Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in útero. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p.997-1002, 1997.

STOUT, T.A.E., TREMOLEDA, J.L., THARASANIT, T., COLENBRANDER, B. Formation of the equine blastocyst capsule. Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III, **Havemeyer Foundation Monograph Series**. n.16, p. 62-63.

TROEDSOM, M. SAGE, A. M. Fetal/placental evaluation in the mare. **International Veterinary Information Service**. Disponível em <http://www.ivis.org> acesso em 17 de nov. 2007.

VAALA, W. E. Peripartum asphyxia syndrome in foals. . In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 45. 1999. **Proceedings...** p.247-253.

VAALA,W.E.,HOUSE,J.K. Manifestation disease in the neonate. In: Smith, B.S. **Large animal internal medicine**. 3th. edition. St. Louis: Mosby, 2002.p.319-81.

VINCE, K. J. *et al.*, Ultrasonographic appearance of fetal fluids between 55 and 176 days of gestation in the mare: effect of mare reproductive loss syndrome. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 48. 2002. **Proceedings...** p. 350-352.

WILLIAMS, M. A. *et al.* Amniotic fluid analysis for ante-partum foetal assessment in the horse. **Eq. Vet. J.**, v. 24. n.3, p.236-238, 1992.

WILLIAMS, M. A. *et al.*, Biochemical characteristics of amniotic and allantoic fluid in late gestational mares. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1251-1257, 1993.

ZEPPERITZ, H., GRÜN, E. Administration of vitamin D, metabolites to dairy cows in late lactation on maternal-fetal mineral metabolism. 2. Influence on mineral content of amniotic and allantoic fluid (in German). In: **Mengen- und Spurenelemente**. 11 Arbeitslagung: Leipzig, 12-13 December 1991, p.78-86.



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

OF.SEMINA: Ci. Agr. – 331/08

Londrina, 04 junho de 2008

Prezado Senhor:

Informamos que o artigo **"ANÁLISE BIOQUÍMICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E ALANTOIDEANO EQUINO DURANTE A GESTAÇÃO"**, dos autores: **Luiz Francisco Zanella, Nereu Carlos Prestes, Regina Kiomi Takahira, Flávio Barca Jr., Gersio Luiz Bonesi**, foi registrado nesta Revista sob o número **779/08** e será encaminhado a assessoria científica, objetivando a sua publicação.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Odilon Vidotto
Coordenador do Comitê Editorial da Revista
SEMINA: Ciências Agrárias

Normas Editoriais para Publicação

Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;

b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;

c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPEs.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "*Ad hoc*" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.
6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.
7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.
8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Edição da SEMINA
Campus Universitário - Caixa Postal 6001
86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E
ALANTOIDEANO EQÜINO DURANTE A GESTAÇÃO.**

**BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE AMNIOTIC AND
ALLANTOIC FLUIDS OF HORSES DURING PREGNANCY.**

Titulo: Análise bioquímica do líquido amniótico e alantoideano eqüino durante a gestação.

Resumo

Os líquidos fetais possuem diversas funções que são vitais para o feto. Para a espécie eqüina até o presente momento, não está totalmente definida a composição bioquímica do líquido amniótico no decorrer da gestação. Analisou-se 60 amostras de fluidos fetais, empregando-se kits comerciais para se determinar a concentração bioquímica para a espécie eqüina da Fosfatase Alcalina (FA), Glicose, Proteínas Totais (PT), Uréia, Creatinina, Cálcio (Ca), Cloreto (Cl), Sódio (Na) e Potássio (K) durante a gestação. A concentração da alfa-fetoproteína (AFT) foi avaliada empregando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. A concentração da FA no líquido amniótico foi maior quando comparada ao líquido alantoideano nas três fases da gestação ($p < 0,05$). Para a glicose o valor médio entre os dois fluidos não apresentou variações ($p < 0,05$). Para a PT o valor médio do líquido amniótico foi maior que o alantoideano ($p < 0,05$). A Uréia sofreu variações na concentração entre as fases, mas não há diferenças dos valores médios ($p > 0,05$) entre os fluidos. Para a Creatinina os valores presentes no líquido alantoideano são mais altos que os valores do líquido amniótico ($p < 0,05$). As concentrações dos íons Cl e Na apresentaram-se mais elevados ($p < 0,05$) no líquido amniótico. As concentrações dos íons Ca e K foram mais elevadas nos líquidos alantoideanos ($p < 0,05$). Porém, faltam estudos na espécie eqüina para a comparação dos resultados do presente trabalho.

Palavras-Chave: eqüino, líquidos fetais, análise bioquímica.

Author's name: ZANELLA, L. F. **Biochemical parameters of the amniotic and allantoic fluids of horses during pregnancy.** 2008.p. Doctorate Thesis in Veterinary Medicine, Area of Animal Reproduction. School of Veterinary Medicine and Zootechnology, Universidade Estadual Paulista , Botucatu.

Abstract

Fetal fluids play a vital role in the development of the fetus. The biochemical composition of the amniotic fluid along pregnancy in horses had not been described until this present study. Sixty samples of fetal fluids were collected and the concentrations of Alkaline Phosphatase (FA), Glucose, Total Proteins (PT), Urea, Creatinin, Calcium (Ca), Chloride (Cl), Sodium (Na) and Potassium (K) along pregnancy were determined using commercially available kits. The levels of alpha-fetoprotein (AFT) were measured by polyacrylamide gel electrophoresis. During the three stages of pregnancy the concentrations of FA in the amniotic fluid were higher than those determined in the allantoic fluid ($p < 0,05$). The glucose levels did not differ between the fluids ($p < 0,05$). The mean values for the concentrations of PT were higher in the amniotic fluid than in the allantoic ($p < 0,05$). The urea levels differ among the pregnancy stages, but there were no differences in the mean values of urea ($p > 0,05$) between the two fluids. The concentrations of creatinin obtained in the allantoic fluid were higher than those obtained in the amniotic fluid ($p < 0,05$). The concentrations of Cl and Na were elevated ($p < 0,05$) in the amniotic fluid. The levels of the ions Ca e K were higher in the allantoic fluid ($p < 0,05$). Although there is a need for more studies in the biochemical composition of fetal fluids in horses to compare the results obtained in this study.

Keywords: horse, fetal fluids, biochemical assays.

Introdução

O líquido amniótico no início da gestação é produzido a partir de secreções do epitélio amniótico e da urina fetal. Posteriormente, com o desenvolvimento da gestação, o esfíncter vesical impede a liberação da urina fetal para a cavidade amniótica e a saliva e as secreções nasais fetais passam a fazer parte da composição do líquido amniótico (ARTHUR, 1969).

Considerando que este fluido envolve diretamente o feto, nele podem ser encontrados pêlos, células epiteliais, resto de escamação cutânea e, nos fetos traumatizados, pode-se ainda, encontrar a presença de mecônio. Nos eqüinos o volume deste fluido varia de três a sete litros e sua coloração normal é amarelada com ligeira viscosidade e, a presença de floculações não é considerada normal.(GRUNERT, BIRGEL,1989).

O líquido alantoidiano possui origem renal, geralmente composto pela urina fetal, o seu volume, na espécie eqüina, é de 4 -10 litros e sua coloração é marrom claro, opaco e ligeiramente turvo (GRUNERT, BIRGEL,1989; FLOOD, 1992; GUINTER, 1998).

Os líquidos fetais possuem diversas funções que são vitais para o feto dentre elas, destacam-se : 1. Proteção contra choques externos, variações de temperatura e desidratação (GRUNERT, BIRGEL, 1982; WILLIAMS et al., 1992; ASBURY, LEBLANC, 1993), 2. Evitar a aderência da pele do feto à membrana amniótica, 3. Promover a lubrificação e a dilatação da via fetal durante a fase de expulsão no parto (GRUNERT, BIRGEL, 1982; ASBURY e LEBLANC, 1993) 4. Também, permite a livre movimentação e o crescimento do fetal no interior do útero (ARTHUR, 1969). 5. Inibir o crescimento bacteriano (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Nas mulheres a amniocentese e a subsequente análise do líquido amniótico são utilizadas para detectar principalmente: doenças congênitas, defeitos de tubo neural, idade gestacional e maturidade fetal pulmonar. O exame é indicado para mulheres acima de 35 anos devido à maior probabilidade de anormalidades cromossômicas fetais (CAMPANA., et al 2003).

O grau de maturação pulmonar dos neonatos humanos é avaliado dosando-se a porcentagem de fosfatidilglicerol e pela relação da taxa de lecitina/esfingomielina presentes no

líquido amniótico, pois eles são constituintes do surfactante pulmonar dos fetos maduros (WILLIAMS et al., 1992). A técnica é realizada por cromatografia o que a torna inviável para a rotina da clínica veterinária. (MARTÍNEZ et al., 1999). Outra substância que está envolvida com a determinação da maturação pulmonar é o cortisol sérico (VAALA, HOUSE, 2002).

O fator hormonal mais importante no início do desencadeamento do parto é a remoção do bloqueio da contratilidade causado pela ação da progesterona (LANDIM-ALVARENGA, 2006; ERENO et al., 2007). Entretanto as observações em caprinos, ovinos, bovinos e humanos indicam que na fase final da gestação ocorre também um aumento significativo na concentração plasmática de cortisol fetal devido a estímulos no eixo hipotálamo-hipófise (BANJANIM et al., 2004; ERENO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007) Acredita-se então que a maturação do hipotálamo do feto resultaria no desenvolvimento de sinapses do núcleo paraventricular, permitindo um aumento na função neuroendócrina fetal. Assim o hipotálamo passaria a responder aos efeitos dos hormônios placentários (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

A maturidade renal, pode ser avaliada através da dosagem de uréia e creatinina presentes no líquido amniótico, no momento do parto pois diversos trabalhos mostram que há um aumento na concentração dessas substâncias no líquido alantoideano ao longo da gestação (WILLIAMS et al., 1992). O rim fetal é afuncional durante o seu período de formação, porém sua contribuição no final do processo de maturação fetal é importante para a sobrevivência do concepto (LUMBERS et al., 1985)

Na obstetria humana algumas enfermidades e a viabilidade fetal podem ser precisamente determinadas através do exame ultrassonográfico do feto no interior do útero, associado à composição bioquímica do líquido amniótico obtida por amniocentese, guiada por ultrassonografia (SCHIMIDT et al., 1991; VAALA, HOUSE, 2002).

Em medicina veterinária, os primeiros estudos para se analisar a fisiologia e o comportamento bioquímico do líquido amniótico, obtido por amniocentese foram realizados primeiramente em ovinos (McDOUGALL, 1949; ALEXANDER et al., 1958; MELLOR e SLATER, 1972). BONGSO E BASRUR (1975) afirmaram que a amniocentese apresentaria aplicação limitada em medicina veterinária devido a alguns fatores como: anatomia do útero

gravídico, dos sacos fetais e dos fluidos fetais. No entanto, (PRESTES et al., 2001) realizaram a dosagem bioquímica dos seguintes elementos: glucose, uréia, creatinina, Gama GT, sódio, potássio, cloro, proteínas totais e pH no líquido amniótico de ovinos utilizando a amniocentese aos 70, 100 e 145 dias de gestação e com sucesso. Dos 26 animais utilizados no experimento apenas 01 ovelha, portadora de parto gemelar abortou após a segunda colheita realizada aos 100 dias de gestação devido a repetidas punções nas duas vesículas. Os resultados encontrados permitiram aos autores concluir que o valor do pH diminuiu ao longo da gestação. A concentração de glicose apresentou uma redução durante o período gestacional. Os valores estatísticos para a uréia mostraram não haver diferença entre 70, 100 e 145 dias. Os valores encontrados para a creatinina evidenciaram um aumento com o avanço da gestação. Os valores de Gama-GT mostraram-se similar nos três momentos especificados para as colheitas, através de laparotomia.

Os valores encontrados para o sódio permitiram os autores concluir que houve uma redução ao longo dos três estágios. Já o potássio apresentou aos 100 dias a maior concentração. Os valores encontrados para o cloreto apresentaram o mesmo comportamento do sódio isto é, sofreram aumento no decorrer da gestação. Os valores encontrados para a proteína total foram baixos 0,14, 0,23 e 0,24g/dl aos 70, 100 e 145 dias da gestação respectivamente.

Em bovinos os primeiros autores a realizarem amniocentese foram (LEIBO, RALL, 1990). Recentemente, Breukelman et al., (2005) estudaram as características intra-uterina da morte fetal embrionária, no terço inicial da gestação correlacionando a aparência do concepto, com a taxa de frequência cardíaca, perfil bioquímico da glicoproteína associada à prenhez, (PAG) e prostaglandina F2 α (PGF2 α) após a indução da morte fetal com aglepristone. Esses autores evidenciaram a ocorrência da diminuição do líquido alantoideano durante o período de estresse fetal que antecede a morte dos fetos bovinos. Eles encontraram também, pouca alteração na taxa de frequência cardíaca em contraste ao que se observa na espécie humana.

Linderberg et al., (2002) empregaram a técnica de amniocentese descrita por Zepperitz e Grün (1991) em vacas em terço final de gestação, Os animais foram previamente infectados experimentalmente com o vírus da (BVD). O objetivo do trabalho era obter líquidos fetais em

condições de “campo” para se detectar a presença do vírus, empregando-se a técnica de (PCR). O procedimento foi aplicado em 09 vacas e nenhuma apresentou complicações decorrentes da amniocentese e, os autores puderam estabelecer um diagnóstico pré-natal de infecção por (BVD), utilizando os líquidos fetais.

Li et al., (2005) estudaram as alterações da composição bioquímica dos fluidos fetais no terço inicial da gestação em bovinos clonados. Eles pretendiam encontrar respostas para a maior ocorrência de hidroalantóide e hidroâmnio nas vacas que gestam fetos obtidos através de clonagem. Eles concluíram que as principais mudanças são decorrentes de alterações no metabolismo e na atividade de transporte dos tecidos que constituem a placenta mas, algumas alterações da composição bioquímica ainda permanecem sem explicações.

MOYA et al., (2006) analisaram por citologia do líquido amniótico obtido no momento do parto, 60 novilhas nelores sendo que 20 foram inseminadas artificialmente, 20 se apresentavam gestantes pela técnica de transferência de embriões e, outras 20 apresentavam-se gestantes pela técnica de fertilização “in vitro” após aspiração folicular. A análise da citologia do líquido amniótico é utilizada em medicina humana. Ela é um método seguro empregado para a avaliação e caracterização epidermal dos fetos em gestações avançadas. AGORASTOS, 1970 *apud* (MOYA et al., 2006). O resultado do trabalho permitiu aos autores concluir que apesar de não ter havido diferenças estatísticas entre os três grupos estudados em questão, a citologia do líquido amniótico das células coradas pelo corante Hematoxilina-Shorr é um método confiável para se determinar o grau de maturidade fetal.

LOVELL et al., (1995) realizaram amniocentese guiada por ultra-som em cabras cujo período gestacional se encontrava entre 59–65 dias, com a finalidade de se estabelecer o diagnóstico pre-natal de mannosidose um distúrbio catabólico que acomete a espécie caprina e bovina. Segundo relatos dos autores a amniocentese se mostrou segura e fácil de se realizar nos caprinos. Dos 13 animais utilizados no experimento apenas um abortou provavelmente, em virtude de ter ocorrido a punção de um placentoma.

As avaliações dos fluidos fetais em cães são escassas. Barreto (2006) empregou o procedimento cirúrgico (cesariana) para a obtenção dos fluidos fetais de cadelas, com o intuito

de avaliar a maturidade pulmonar dos fetos desta espécie e, relatou que o teste de Clements modificado pode ser empregado para a avaliação da viabilidade fetal e maturidade pulmonar. Afirmou também, que a análise celular com Azul de nilo (0,1%) permite a observação de células morfológicamente diferentes permitindo assim, avaliar a maturidade pulmonar fetal. Outro dado analisado pela autora foi a densidade óptica dos líquidos fetais. Ela concluiu que valores superiores a 0,150 são indicativos de maturidade pulmonar para a espécie canina.

Em outro estudo BARRETO et al., (2006) avaliaram a composição bioquímica dos fluidos alantoideano e amniótico totalizando 20 amostras obtidas de 06 cadelas entre 30 a 40 dias de gestação. As variáveis analisadas foram: proteínas totais, glicose, uréia, creatinina, cloretos totais e glicose. Dos constituintes propostos para a análise, os valores de proteínas totais apresentaram diferença estatística entre os fluidos alantoideano e amniótico. Esse resultado reflete o fato das proteínas se constituírem nos elementos mais abundantes dos fluidos fetais e que sofrem maior influência da fisiologia fetal. A avaliação dos outros elementos não apresentou diferença estatística, podendo refletir então a sincronia dos fluidos na manutenção do equilíbrio eletrolítico nestes dois compartimentos.

As primeiras tentativas de amniocentese na espécie eqüina, antes do desenvolvimento da ultrassonografia, causaram um alto índice de abortos nas éguas gestantes, fato que desencorajou as pesquisas sobre a aplicabilidade do procedimento para a espécie e que devido à conformação anatomofisiológica das estruturas não ocorriam na espécie humana (ASBURY, LEBLANC, 1993).

Porém, com o advento da ultrassonografia tornou-se possível realizar a amniocentese trans-abdominal guiada por ultra-som (RENAUDIN et al., 1997; VINCE et al., 2002). Com isso, é possível identificar com precisão, a cavidade amniótica e alantoideana, o que elevou o índice de sucesso do procedimento (SCHIMIDT et al., 1991).

Recentemente LYLE et al., (2006) desenvolveram uma técnica para colocação de cateter no interior da cavidade alantoideana com a finalidade de se poder obter amostras de líquido alantoideano em vários momentos. O procedimento foi realizado utilizando-se 29 éguas no período compreendido entre 2003 – 2005. Os animais foram sedados empregando-se a

associação de dois fármacos detomidina e butorfanol e, em seguida, procedeu-se a infiltração local com lidocaína a 2% na parede abdominal das fossas paralombares. A associação dos procedimentos de laparoscopia guiada por ultrassonografia permitiu uma excelente visualização do útero e da cavidade alantoideana e elevou significativamente a taxa de sucesso do procedimento. Outro fator que colaborou sobremaneira, para elevar a taxa de eficiência da técnica, segundo os autores, foi o emprego de cateteres de borracha utilizados para nefrostomia. Os cateteres foram mantidos nas éguas do estudo conduzido em 2004 por 06 dias em média. Em outro experimento conduzido em 2005 com o cateter para nefrostomia, com a mesma finalidade foi possível mantê-lo fixado nas éguas por até 9 dias em média. Este procedimento possibilitou a colheita de fluido alantoideano nos momentos da cirurgia, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 36, 42, 50 horas após a colocação do cateter.

As complicações relatadas pelos autores foram: falência da fixação do cateter resultando em desprendimento dos mesmos, fato que ocorreu em 03 animais. Mas, a mais grave das complicações encontradas foi a infecção ao redor do ponto de fixação do cateter que ocorria, em média, após o quinto dia de pós-operatório. Em algumas éguas essa infecção chegou mesmo, a se estender para o interior da cavidade alantoideana. No entanto esse fato não trouxe maiores complicações para as éguas pois, no ano seguinte os mesmos animais foram novamente aproveitados para outro experimento com a mesma finalidade sem contudo, apresentarem problemas para a fecundação e gestação (LYLE et al., 2006).

MURCHIE et al., (2003) realizaram uma técnica de microdiálise do líquido alantoideano equino através de laparotomia trans-abdominal, com a finalidade de se detectar a concentração de algumas drogas. Dentre elas merecem destaque a penicilina G, gentamicina e o flunexim meglumine presentes no líquido alantoideano de éguas gestantes. Das 9 éguas utilizadas para a realização do experimento, somente 01 abortou segundo relatos do autor.

No entanto, para a espécie equina até o presente momento, não está totalmente definida a composição bioquímica do líquido amniótico no decorrer da gestação. Os trabalhos que versam sobre o assunto são escassos. Portanto, ainda não existem métodos capazes de determinar, com exatidão, o grau de maturação de alguns órgãos. (VAALA, HOUSE, 2002).

Assim, ainda é difícil estabelecer, juntamente com outros métodos aplicados em perinatologia, a idade gestacional do concepto equino e, por conseguinte, estabelecer o nível de estresse que esse produto irá enfrentar no momento do parto (WILLIANS et al., 1992; VAALA, HOUSE, 2002).

Smith et al. (1997) conseguiram com sucesso detectar a presença de herpesvírus tipo I no líquido amniótico de éguas gestantes, antes mesmo da ocorrência do abortamento.

Kochhar et al., (1997) avaliaram os líquidos fetais de 22 éguas as quais se encontravam numa mesma propriedade. Em 11 delas o parto transcorreu normalmente. As outras 11 éguas no entanto, apresentaram partos distócicos. Os fluidos foram colhidos no momento da parição por centese da bolsa alantoideana e amniótica. Nas éguas portadoras de distocias, a proteína total apresentou valores menores já os valores obtidos para a uréia, creatinina e glicose, nesse grupo foram mais altos. O valor do sódio no líquido alantoideano foi bem menor quando comparado ao valor encontrado no líquido amniótico. Os valores obtidos para a dosagem dos íons potássio e cálcio mostraram que os mesmos apresentaram-se maiores no fluido alantoideano. No entanto, os autores destacam a ausência de trabalhos e estudos que possam servir como parâmetros para se avaliar as diferenças na composição bioquímica dos líquidos fetais das éguas. A intensidade e o tipo do trabalho de parto podem interferir na composição bioquímica dos fluidos fetais nesta espécie (Kochhar et al., 1997)

Segundo JONKER (2004) a viabilidade fetal na espécie equina pode ser avaliada através de dosagens dos parâmetros bioquímicos, hormonais e exames ultra-sonográficos dos líquidos fetais e da placenta. Mas para tanto, se faz necessário mais estudos para se identificar a composição dos líquidos fetais em cada fase da gestação da égua.

4. Materiais e Métodos:

Foram utilizadas amostras de líquidos amnióticos e alantoideanos de éguas gestantes. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, com vinte animais em cada grupo. Esta divisão se fundamentou nos três períodos clássicos da gestação (terço inicial, médio e final). O terceiro inicial compreende o período até os 90 dias de gestação. O terceiro médio compreende o período entre os 90 a 240 dias de gestação e o terceiro final corresponde à idade gestacional a partir dos 270 dias de gestação.

Colheita das amostras: As amostras dos líquidos fetais foram obtidas diretamente do útero das éguas que foram abatidas no frigorífico especializado em abate e comercialização de carne equina. No mesmo dia do abate das éguas, se realizava a dissecação do útero e posteriormente das membranas corioalantoideana e a amniótica em seguida, se realizava alantoideocentese e amniocentese com o auxílio de agulhas 30x08¹² e seringas estéreis¹³ de 20ml. Os materiais colhidos eram colocados em tubos de ensaios em duplicata quando possível, e congelados e estocados em freezer a -20C° para posterior avaliação (WILLIANS et al.,1992). O período gestacional na qual a égua se encontrava, no momento da colheita, foi determinado utilizando-se a metodologia proposta por ROBERTS, (1986).

Análise bioquímica dos líquidos fetais: Foram pesquisados e quantificados os seguintes elementos nos líquidos fetais das éguas: fosfatase alcalina, glicose, proteínas totais, uréia, creatinina, lactato desidrogenase e os íons cálcio, cloreto, sódio e potássio.

Todas as dosagens foram realizadas no espectrofotômetro CELM, modelo SB-190, com exceção do sódio e potássio cuja dosagem foi realizada no fotômetro de chama CELM, modelo FC-280.

Para a dosagem da fosfatase alcalina¹⁴ a técnica empregada foi o método cinético, baseado na hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela fosfatase alcalina no soro ou plasma em pH 9,8 cuja velocidade de formação (em comprimento de onda de 450 nm) é proporcional à atividade da enzima presente.

Para a dosagem do LDH¹⁵ a técnica empregada foi o método cinético para determinação no plasma ou soro. A técnica baseia-se na conversão do piruvato pela LDH em lactato, transformando o NADH2 em NAD. A velocidade de diminuição da absorbância em 340 nm é proporcional à atividade desidrogenásica presente.

¹² Agulhas hipodérmicas BD

¹³ Seringas estéreis BD.

¹⁴ - Fosfatase alcalina - Kit Katal.

¹⁵ LDH - Kit Katal

A proteína total¹⁶ foi dosada pelo método colorimétrico (Bradford modificado) que utiliza corante Coomassie azul brilhante para detectar quantidades mínimas de proteínas. Esse corante forma um complexo com albumina e diferentes variedades de globulinas existentes no líquido e urina. A leitura em espectrofotômetro é realizada 610 nm.

Para a dosagem da glicose¹⁷ o método utilizado foi o enzimático-colorimétrico segundo Trinder para determinação de glicose em soro, plasma, ou outros líquidos biológicos. Baseia-se na atividade das enzimas glicose oxidase e peroxidase, em comprimento de onda de 505 nm.

A creatinina¹⁸ foi dosada pelo método cinético para determinação da creatinina em soro, plasma, urina e líquido amniótico. A creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino, e mede-se a velocidade de formação do picrato alcalino, obtendo-se duas leituras espectrofotométricas em 510 nm.

A Uréia¹⁹ foi dosada pelo método enzimático-colorimétrico para determinação da uréia no sangue e urina. Ele baseia-se na hidrólise da uréia pela enzima uréase, com produção de gás carbônico e íons amônio, em 600 nm. A cor formada é proporcional à concentração de uréia presente na amostra.

O Cálcio²⁰ foi dosado pelo método colorimétrico empregado para soro, plasma ou urina. O cálcio reage com a cresolftaleína complexona (púrpura de ftaleína) em meio alcalino formando um complexo intensamente corado, em 570 nm. A absorbância é proporcional à quantidade de cálcio presente na amostra

O íon Cloreto²¹ foi dosado pelo método colorimétrico para determinação da concentração de cloretos em amostras de soro, urina e líquido, através de reação de ponto final. Ela baseia-se na reação dos íons cloreto com tiocianato de mercúrio. Os íons tiocianato quando combinados com os íons férricos formam tiocianato férrico, de coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloretos. Leitura realizada em 470 nm

¹⁶ Proteínas Totais - Kit Microprote-Doles

¹⁷ Glicose - Kit Celm.

¹⁸ - Creatinina – Kit Katal

¹⁹ -Uréia – Kit Katal

²⁰ -Cálcio – Kit Katal

²¹ -Cloreto – Kit Labtest

Os íons Sódio e Potássio²² foram dosados pelo método de fotometria de chama para determinação de íons sódio, potássio e lítio em amostras de soro livre de hemólise. Isto se baseia-se na excitação térmica de metais alcalinos, com emissão de uma onda de frequência discreta, a qual pode ser isolada por um filtro ótico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, determina a concentração do íon na amostra.

4.6. Análise estatística:

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico BioEstat 4.0 (AYRES *et al.*; 2005) sendo que os valores das classes (variáveis) que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes (Proteína e Uréia do Líquido Amniótico) foram realizados através do teste de análise de variância (ANOVA) e para verificação das diferenças entre os terços gestacionais teste de Tukey. Nas classes a serem avaliadas que não obedeciam aos critérios de distribuição normal e/ou variâncias semelhantes (demais classes do líquido Amniótico e todas do Líquido Alantóideano), os valores foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1998) e as comparações necessárias através do teste de Student-Newman-Keuls. O valor de significância mínima foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. Resultados:

Foram colhidos um total de 60 amostras de líquido amniótico e alantoideano, sendo 20 para gestações com idades iguais ou menores a 03 meses, 20 para gestações com idades entre 4 – 8 meses e, 20 para gestações com idades maiores ou iguais a 9 meses.

As médias dos valores para Fosfatase alcalina (FA), Glicose, Proteínas totais (Pt) Uréia, Creatinina, Cálcio (Ca), Cloreto (Cl), Sódio (Na) e Potássio (K) para cada fase gestacional encontram-se na Tabela 1.

²²-Sódio e Potássio – Kit CELM

Tabela 1: Análise bioquímica dos líquidos amniótico e alantoideano eqüino durante a gestação.

Análise Bioquímica	Líquido Amniótico			Líquido Alantoidiano		
	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final	Terço Inicial	Terço Médio	Terço Final
FA	69,62 ^a	104,23 ^b	51,46 ^a	18,76 ^a	19,21 ^a	19,98 ^a
Glicose	7,51 ^a	12,26 ^a	4,01 ^b	7,19 ^a	16,43 ^b	5,16 ^a
Proteína total	35,78 ^a	51,95 ^b	30,72 ^a	10,81 ^b	40,53 ^a	32,07 ^a
Uréia	59,99 ^b	49,32 ^a	43,45 ^a	65,74 ^a	61,84 ^a	41,68 ^b
Creatinina	0,30 ^a	1,93 ^b	4,27 ^c	0,41 ^a	7,60 ^b	13,91 ^c
Ca	5,43 ^a	8,37 ^b	5,69 ^a	4,12 ^b	17,66 ^a	20,15 ^a
Cl	19,54 ^a	33,83 ^b	21,20 ^a	7,54 ^b	4,82 ^a	2,95 ^a
Na	96,95 ^a	130,15 ^b	92,10 ^a	18,15 ^b	41,00 ^a	48,40 ^a
K	8,10 ^a	5,99 ^a	6,61 ^a	7,60 ^a	12,09 ^b	8,13 ^a

Letras iguais na mesma linha e no mesmo líquido fetal indicam não haver diferença significativa ($p>0,05$).

6. Discussão

Ao consultarmos a literatura, chama à atenção a escassez de trabalhos a respeito da fisiologia obstétrica e, principalmente, sobre a composição bioquímica dos líquidos amnióticos e alantoideanos nos eqüinos, embora, se encontre diversos trabalhos voltados para a assistência ao parto da égua e sobre o diagnóstico da gestação nesta espécie.

Um dos principais empecilhos para o desenvolvimento da fisiologia obstétrica nos eqüinos foi sem dúvida, a dificuldade de se obter com relativa segurança os fluídos amnióticos e alantoideano nas éguas, fato que não ocorreu no ser humano e em outras espécies animais como os ovinos, caprinos e até mesmo, os bovinos. Contudo, a amniocentese na égua durante muitos anos desencadearam problemas como infecções uterinas que inviabilizava a continuidade da vida intra-uterina do concepto e até mesmo, a ocorrência de abortamentos em virtude de traumas decorrentes de varias perfurações da cavidade alantoideana e amniótica para a obtenção dos fluidos fetais (ASBURY, LEBLANC, 1993).

O advento da ultrassonografia permitiu acompanhar o posicionamento do cateter durante a realização do procedimento cirúrgico de laparocentese trans-abdominal (RENAUDIN et al., 1997; VINCE et al., 2002). Este fato trouxe grandes avanços para o procedimento (SCHIMIDT et al., 1991) somados ao desenvolvimento de novos materiais para a confecção de

sondas destinadas a cateterizar órgãos delicados como os rins dos humanos, (MURCHIE et al., 2003; LYLE et al., 2006). Muito embora, pelo fato do custo dos equipamentos ser elevado inviabiliza a realização do procedimento, na rotina obstétrica da maioria dos hospitais veterinários.

Diante desse fato, optou-se por trabalhar com peças oriundas de abatedouro especializado no comércio da carne equina, para a obtenção dos fluidos fetais. Com isso, o custo financeiro para a realização do experimento tornou-se bem menor, o que permitiu a sua realização.

A colheita dos fluidos fetais, das bolsas amnióticas e alantoideanas dos fetos que se encontravam com 03 meses ou mais de idade gestacional transcorreram sem problemas. Haja vista, a grande quantidade de volume dos fluidos. No entanto, o mesmo não aconteceu para os fetos com idade gestacional abaixo de 03 meses, pois o reduzido volume das amostras colhidas durante o experimento, dificultou as mensurações propostas. O volume médio obtido para este grupo foi de 2 mL.

Foram colhidos um total de 60 amostras de líquido alantoideano e amniótico, sendo 20 para gestações com idades iguais ou menores que 03 meses, 20 para gestações entre 4 – 8 meses e 20 para gestações com idade maiores ou iguais a 9 meses e respectivamente classificados como grupo 1, 2 e 3.

Os valores das médias encontradas para a fosfatase alcalina (FA) no líquido amniótico revelaram a ocorrência de um aumento significativo no terço médio da gestação. Assim, para os valores das médias entre o terço inicial e terço médio obteve-se $p = 0,003$ e para o terço médio e final obteve-se $p = 0,004$. No entanto, entre o terço inicial e final não houve variações estatísticas significantes $p = 0,254$. No entanto, os valores das médias da (FA) no líquido alantoideano não sofreram variações significativas ao longo do período gestacional $p > 0,05$.

Todavia, não foi possível comparar esses resultados com os de outros autores devido à escassez de trabalhos, sobre esse tema na literatura. Porém, os valores da FA no líquido amniótico se apresentaram bem mais elevados nos três momentos do experimento quando comparados aos observados para o líquido alantoideano. Assim, os resultados estatísticos são

parecidos aos observados por KOCHHAR et al., (1997) para a espécie eqüina. Embora os valores das médias dos dois trabalhos sejam diferentes. No presente estudo para o terço final da gestação no líquido amniótico ela foi de 51,46 U/L resultado bem inferior ao relatado pelo outro autor que foi de 96,95U/L. Para o fluido alantoideano o presente estudo encontrou a média de 19,98 U/L enquanto o outro autor observou a média de 25,63U/L. Agora ao se comparar as médias da FA entre os dois fluidos evidenciou-se o que a FA se encontra em maior quantidade no líquido amniótico, com diferenças significantes para os três estágios da gestação. A FA está correlacionada com a maturidade fetal, formação óssea fetal e principalmente, com a função renal. Nos estágios iniciais, da gestação em humanos, acredita-se que o aumento da sua intensidade está ligado a descamação do epitélio intestinal (HAHNEMANN, 1974).

No presente estudo, os valores das médias para a glicose no líquido amniótico, no terço final da gestação, apresentou um valor significativamente menor. Portanto, quando se compara os valores dos terço iniciais e médio não se observa diferenças estatísticas. No entanto, entre o terço inicial e final há diferenças significantes $p = 0,254$. O mesmo ocorre entre o terço médio e o final $p = 0,0001$. Para o líquido alantoideano a glicose apresentou um aumento significativo no terço médio da gestação. Assim, evidenciam-se diferenças estatísticas entre o terço inicial e médio, $p = 0,003$ e, entre o terço médio e o final, $p = 0,001$. Agora quando se compara as médias da glicose do líquido alantoideano com as médias do líquido amniótico observa-se que a quantidade de glicose presente no líquido alantoideano é maior e possui significância para o terço final da gestação. Estes resultados são contrários aos relatados por KOCHHAR et al., (1997) que encontraram valores mais altos para o líquido amniótico. Assim, ao se comparar os resultados dos dois trabalhos nota-se que os valores das médias do líquido alantoideano são bastante semelhantes. Já os valores encontrados para o líquido amniótico são diferentes sendo 4,01mg/dL para o presente experimento e 20,1mg/dL para os resultados do outro autor, no terço final da gestação. Nenhum outro estudo dosou a glicose no decorrer da gestação na espécie eqüina.

Em ovinos PRESTES et al., (2001) encontraram valores diferentes estatisticamente para a glicose ao compararem a quantidade presente no líquido amniótico aos 70, 100, e 145 dias de

gestação. Os autores relatam também, que houve uma redução dos valores ao longo do período gestacional na ovelha. Fato que se assemelha ao observado neste experimento e que provavelmente se deve a ingestão de glicose decorrente do reflexo de deglutição fetal. Ademais, a concentração de glicose pode se apresentar de maneira diferente entre as espécies pois, BARRETO et al., (2006) dosou a glicose nos fluidos fetais de cadelas aos 30 e 40 dias de gestação e não encontrou variações dos valores entre o líquido alantoideano e amniótico.

As médias encontradas para a proteína total no líquido amniótico durante este experimento, revelam que houve um aumento significativo no terço médio da gestação. Portanto entre o terço inicial e médio há diferenças significativas $p < 0,01$. Entre o terço inicial e final não há diferenças $p > 0,05$ e, entre os o terço médio e final há diferenças significativas, $p < 0,01$. No líquido alantoideano, os valores encontrados revelam um aumento no terço médio da gestação o qual permaneceu até o terço final. Contudo, os valores encontrados neste estudo, em questão, para o líquido alantoideano são muito diferentes daqueles resultados obtidos por KOCHHAR et al., (1997) para o terço final da gestação, sendo que o mesmo fato se repete para a PT presente no líquido amniótico. Ao se comparar os valores entre os fluídos fetais observam-se maiores quantidades de PT no líquido amniótico para o terço inicial e médio. Já para o terço final os valores das médias se equivalem.

No entanto o comportamento dos valores das médias da PT no líquido amniótico ao longo da gestação não foi semelhante ao observado por Prestes et al., (2001) para a espécie ovina. Onde a (PT) se elevou aos 100 dias de gestação e permaneceu praticamente constante. Não obstante, os valores encontrados neste experimento se assemelham aos obtidos em outras espécies no que tange a pequena quantidade de proteína presente nos fluidos fetais (REDDY et al., 1995; PRESTES et al., 2001; BARRETO et al., 2006). Pois, para se poder analisar a (PT) neste experimento, houve a necessidade de se empregar o método colorimétrico (Bradford modificado) que é capaz de detectar quantidade mínima de proteína. Uma vez que, o kit empregado para se avaliar a (PT) na rotina, não foi sensível, o bastante, para se dosar as proteínas presentes nos líquidos fetais da égua.

A média dos valores para a uréia no líquido amniótico apresentou um valor mais elevado e significativo, segundo os cálculos estatísticos, na fase inicial da gestação $p < 0,05$. O mesmo fato foi observado no líquido amniótico de ovinos por PRESTES et al., (2001). Posteriormente, para o terço médio e final os valores não sofreram alterações. O valor da média no presente estudo, para o terço final da gestação foi de 43,45 mg/dL resultado muito semelhante ao encontrado por KOCHHAR et al., (1997), que relataram um valor de 41,7 mg/dL para o líquido amniótico de éguas que não apresentaram partos distócicos.

A média dos valores da uréia no líquido alantoideano revelaram não haver diferenças de valores entre o terço inicial e médio da gestação $p = 0,624$. Porém, ocorreu uma diminuição do valor no terço final da gestação onde $p < 0,005$. Tal fato pode ser decorrente da grande quantidade de urina presente no saco alantoideano no terço final da gestação (MELLOR et al., 1975). A média obtida neste trabalho para a uréia no terço final de gestação foi de 41,68 mg/dL valor próximo ao encontrado por KOCHHAR et al., (1997) que foi de $27,75 \pm 9,48$ mg/dL. Contudo, quando comparamos os valores da uréia no líquido amniótico e alantoideano observou-se que os valores foram diferentes apenas no terço médio da gestação onde a média do líquido alantoideano se apresentou mais elevada. Esse resultado difere dos observados por BARRETO et al., (2006) em cadelas, ao dosar a uréia entre 30 e 40 dias de gestação. Pois, esses autores não encontraram diferenças estatísticas entre o líquido alantoideano e amniótico.

A média dos valores da creatinina presente no líquido amniótico se elevou ao longo do período gestacional. Os valores apresentaram diferenças significativas entre o terço inicial e o médio $p = 0,004$ e, entre o terço médio e o terço final $p = 0,003$. No entanto, os valores obtidos para a creatinina no terço final de gestação, neste experimento foi de 4,27mg/dL valor bem menor que os relatados por KOCHHAR et al., (1997) que foi de $19,38 \pm 4,67$ mg/dL. Para o líquido alantoideano o valor observado também apresentou variações significantes ao longo da gestação. Os valores apresentaram diferenças significativas entre o terço inicial e o médio $p = 0,001$ e, entre o terço médio e o terço final $p = 0,01$. Entretanto, o valor observado de 13,91mg/dL é muito inferior aos obtido por KOCHHAR et al., (1997) que foi de 68,7mg/dL. Ao compararmos os valores entre os líquidos amnióticos e alantoideanos observa-se valores

estatisticamente diferentes para o terço médio e final da gestação, sendo os valores presentes no líquido alantoideano superior ao do líquido amniótico. Essa observação no presente trabalho está em conformidade com o resultados encontrados por KOCHHAR et al., (1997). O aumento da taxa de creatinina está correlacionado com a maturidade renal (PRESTES et al., 2001) e também; com a atividade muscular fetal (KOCHHAR et al., 1997). E segundo VAALA, (1999) os fetos equinos que são acometidos pela síndrome da asfixia no pré-parto apresentam alteração do valor da creatinina em função da redução do fluxo sanguíneo destinado a perfusão renal. Porém, essa observação da diferença dos valores entre os fluidos fetais para a creatinina não foi observado nas cadelas por BARRETO et al., (2006).

A média do íon cálcio do líquido amniótico, no terço médio da gestação foi de 8,37mg/dL apresentando uma elevação significativa quando comparada com o terço inicial $p = 0,01$ e final da gestação $p = 0,04$. Para o líquido alantoideano, o íon cálcio apresentou uma elevação ao longo da gestação, sendo que a média obtida no terço inicial foi de 4,12mg/dL mais baixa e estatisticamente diferente das médias observadas para o terço médio de 17,66 mg/dL e também, para o terço final de 20,15mg/dL onde $p = 0,001$. Todavia, ao se comparar os valores obtidos entre os líquidos fetais observa-se que no terço inicial da gestação os valores são semelhantes enquanto que para o terço médio e final há diferenças estatísticas significantes e a quantidade de íon Ca se apresenta mais elevada no líquido alantoideano. Esses resultados se assemelham aos obtidos por KOCHHAR et al., (1997) porém a unidade utilizada por esses autores foi mEq/L. Os mesmos autores atribuem a maior concentração de íons Ca no líquido alantoideano a atividade renal. Ademais, faltam trabalhos sobre o assunto para se estabelecer novas comparações.

A média da concentração do íon cloreto (Cl) no líquido amniótico no terço médio do período gestacional foi de 33,83mEq/L, se apresentando mais alta e estatisticamente diferente das medias obtidas no terço inicial e final da gestação. Este fato não foi observado por PRESTES et al., (2001) em líquido amniótico de ovelhas. Onde os autores encontraram valores estatisticamente diferentes no decorrer da gestação. No líquido alantoideano houve uma redução significativa estatisticamente da concentração do íon (Cl) do terço inicial para o terço médio.

Este valor permaneceu sem sofrer alteração significativa, entre este momento e o terço final da gestação. Não obstante, ao se comparar os valores de (Cl) encontrados no líquido alantoideano e amniótico evidencia-se uma concentração mais elevada e, estatisticamente significativa, no líquido amniótico. Isto se fez presente nos três períodos do experimento.

A média da concentração do íon sódio (Na) no líquido amniótico se apresentou mais alta no terço médio 130,15mEq/L. Ela é estatisticamente significativa quando comparada ao terço inicial e final. A concentração encontrada no terço final foi de 92,10 mEq/L. Esse valor é menor ao observado por KOCHHAR et al., (1997). Porém esse fato não foi observado por PRESTES et al., (2001) em ovinos, que encontraram uma redução significativa da concentração de (Na) ao longo da gestação. No líquido alantoideano as médias da concentração de (Cl) não sofreram variações significativas durante a gestação. Entretanto, ao se comparar os valores da concentração deste íon presente no líquido alantoideano e amniótico observa-se que a concentração é mais alta e significativa no líquido amniótico, nos três momentos gestacionais determinados para a realização do experimento. Sendo que a maior diferença se deu no terço médio da gestação. Esse resultado não se assemelha ao observado por BARRETO et al., (2006) em cadelas.

As médias da concentração de potássio (K) não sofreram variações significativas no líquido amniótico ao longo do período gestacional. Para o terço final da gestação a média encontrada foi de 6,61mEq/L. Esse valor está bem próximo ao observado por KOCHHAR et al., (1997) que encontraram uma concentração de 9,2mEq/L. Para o líquido alantoideano a média da concentração do (K) foi de 12,09 mEq/L se apresentando mais elevada e estatisticamente diferente no terço médio. Para o terço final a concentração de (K) foi de 8,13mEq/L valor também bastante próximo dos encontrados por KOCHHAR et al., (1997). Outrossim ao se comparar as médias das concentrações do (K) presente nos líquidos fetais observa-se que no terço médio a concentração é maior e, significativa no líquido alantoide. Isso está relacionado com o aumento da produção da urina fetal mas também, com o aumento da atividade metabólica do feto durante a gestação (KOCHHAR et al., 1997; PRESTES et al., 2001).

Não foi possível de se realizar a dosagem do Lactato desidrogenase (LDH) empregando-se o método cinético para determinação no plasma ou soro. A técnica baseia-se na conversão do piruvato pela LDH em lactato, transformando o NADH₂ em NAD. Os resultados obtidos foram muito dispares. Tentou-se então, utilizar um kit de outra marca. Porém, sem sucesso e, para se verificar se os kits estavam sem problemas, dosou-se a (LDH) de um cão. O resultado obtido estava dentro dos padrões de normalidade. No entanto KOCHHAR et al., (1997) em seu trabalho relata a dosagem de (LDH). Entretanto, o autor não menciona a técnica empregada.

Conclusões

As análises bioquímicas dos líquidos fetais eqüinos realizadas neste experimento revelaram que:

- Fosfatase alcalina: no líquido amniótico apresentou um aumento no terço médio e, valores sem diferenças significantes entre o terço inicial e final da gestação. No líquido alantoideano não houve variações significantes ao longo do período gestacional. A concentração no líquido amniótico foi significativamente maior quando comparada ao líquido alantoideano nas três fases da gestação.
- Glicose: no líquido amniótico não apresentou variação entre as três fases da gestação. No líquido alantoideano apresentou aumento no terço médio e, valores sem diferenças significantes entre o terço inicial e final da gestação. A concentração da glicose foi significativamente maior no líquido alantoideano quando comparada ao líquido amniótico no terço final da gestação, mas o valor médio entre os dois fluidos não apresentou diferenças estatísticas.
- Proteína total: no líquido amniótico apresentou aumento no terço médio e, valores sem diferenças significantes entre o terço inicial e final da gestação. No líquido alantoideano, ela apresentou valor estatisticamente menor no terço inicial da gestação. Posteriormente, não sofreu variações entre o terço médio e o final. A concentração apresentou-se estatisticamente superior no líquido amniótico no terço inicial e médio da gestação, quando comparada ao líquido alantoideano, sendo o valor médio do líquido amniótico estatisticamente superior.
- Uréia: no líquido amniótico apresentou valor estatisticamente superior no terço inicial da gestação. Posteriormente, não sofreu variações entre o terço médio e final. No líquido

alantoideano apresentou valor estatisticamente inferior na fase final da gestação. A concentração foi significativamente maior no líquido alantoideano no terço médio da gestação, mas não há diferenças estatísticas entre os valores médios dos dois fluidos ao longo do período gestacional.

- Creatinina: mostrou-se elevada significativamente durante a gestação nos fluidos fetais a partir do terço médio. Os valores presentes no líquido alantoideano são significativamente maiores que os valores encontrados no líquido amniótico e o seu valor médio, também é estatisticamente maior.

- Íon cálcio: no líquido amniótico apresentou um aumento no terço médio e, valores sem diferenças significantes entre o terço inicial e final da gestação. A concentração no líquido alantoideano elevou-se significativamente no terço médio da gestação e, permaneceu elevada no terço final sem apresentar diferença estatística, entre o terço médio e final. A partir do terço médio os valores foram estatisticamente maiores no líquido alantoideano, sendo o seu valor médio estatisticamente maior.

- Íon cloreto: no líquido amniótico apresentou aumento significativo no terço médio e, valores sem diferenças estatísticas entre o terço inicial e final da gestação. No líquido alantoideano apresentou-se estatisticamente superior no terço inicial da gestação posteriormente, manteve-se sem diferenças entre o terço médio e final. Ele apresentou-se estatisticamente maior no líquido amniótico nas três fases gestacionais.

- Íon sódio: no líquido amniótico apresentou aumento significativo no terço médio e, valores sem diferenças estatísticas entre o terço inicial e final da gestação. A concentração no líquido alantoideano elevou-se significativamente no terço médio da gestação e, permaneceu elevada no terço final sem apresentar diferença estatística, entre o terço médio e o final. Também, apresentou-se estatisticamente maior no líquido amniótico nas três fases gestacionais.

- Íon potássio: não apresentou variações estatísticas no líquido amniótico durante as fases gestacionais. No líquido alantoideano apresentou aumento significativo no terço médio e, valores sem diferenças estatísticas entre o terço inicial e final da gestação. A concentração no líquido alantoideano elevou-se significativamente no terço médio da gestação e posteriormente,

houve diminuição significativa, voltando a apresentar uma concentração próxima a do terço inicial. Porém, o valor médio no líquido alantoideano é estatisticamente maior.

Contudo há escassez de trabalhos sobre avaliações bioquímicas dos fluidos fetais na espécie equina para que se possam estabelecer comparações com os resultados obtidos neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGORASTOS, T. Antenatal estimation of fetal maturity by exfoliative cytology of amniotic fluid. **Z. Geburtshilfe Perinatol.**, v. 183, p.118-127, 1979.

ALEXANDER, D.P., NIXON, D.A., WIDDAS, W.F., WOHLZOGEN, F.X. Gestational variations in the composition of the foetal fluids and foetal urine in the sheep. **J. Physiol.** v.140, p.1-13, 1958.

ALVAREZ-NAVA, F., SOTO, M., PADRÓN, T., MORALES, A., VILLALOBOS, D., ATENCIO, A.R., PRIETRO, M., MARTINEZ, M.C. Cribado prenatal sérico materno para la detección da anormalidades cromossômicas fetales: importância clínica de la tasa de falsos positivos. **Invest. Clin.**, v. 44, n.3, p.195-207, 2003.

ARTHUR, G.H. The Fetal fluids of domestic animals. **J. Reprod. Fertil.**, v.9, p.45-52, 1969.

ASBURY, A.C., LeBLANC, M.M. The placenta. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. p.509-516.

BANJANIN, S., KAPOR, A., MATTHEWS, S.G. Prenatal glucocorticoid exposure alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and blood pressure in mature male guinea pigs. **J. Physiol.**, v. 558.1, p. 305-318, 2004.

BARRETO, C.S. Aspectos fisiológicos da maturidade fetal em cães. Tese de Doutorado. FMVZ-UNESP-Campus de Botucatu, 2006, 74p.

BARRETO, C.S., SOUZA, F.F., PRESTES, N.C. Avaliação bioquímica dos fluidos amniótico e alantoideano de cadelas entre 30 a 40 dias de gestação. **Rev. Portuguesa Cienc. Vet.**, v.101, p.215-217, 2006.

BJÖRKMAN, N. Fine struture of the fetal-maternal área of Exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. **Acta Anat.**, v.86, suppl.1, p.1-22, 1973.

BONGSO, T.A., BASRUR, P.K. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. **Vet. Rec.**, v.96, p.124-127, 1975.

BREUKELMAN, S.P., SZENCI, O., BEKERS, J-F., KINDAHL, H., MULDER, E.J.H., JONKER, F.H., WEIJDEN, B. van der, REVY, D., POGANY, K., SULON, J., NÉMEDI, I., TAVERNE, M.A.M. Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F2 α -metabolite (PGF2 α -metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. **Theriogenology**, v.64, p.917-933, 2005.

CAMPANA, S.G., CHÁVEZ, J.H., HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido fetal. **J. Bras. Patologia Med. Labor.** V. 39, p. 215-218, 2003.

CARBONE, B. et al. changes in plasma and amniotic fluid endothelin levels during pregnancy: facts or artifacts. **European journal of obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.76, p.15-19, 1998.

DELAMARRE, F.M.C. et al. Effect of angiotensin infusion on plasma endothelin in pregnancy. **European journal of obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.77, p.33-35, 1998.

ERENO, R.L., MOYA, C.F., PIAGENTINI, M., OBA, E. Concentração plasmática de progesterona e cortisol durante o final da gestação e início do pós-parto de vacas e novilhas Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 17, 2007, Curitiba, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2007, p.10.

GORDON, E.D., BRACERO, F.M., VARGAS, M.L., DÍAZ, O.C. Evaluación Del programa de diagnóstico prenatal de las malformaciones congêntas por cuantificación de La alfafetoproteína. Camaguey 1985-1998. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.1, p.5-10, 2003.

GRUNERT, E., BIRGEL, E.H. **Obstetrícia veterinária.** 3 ed. Porto Alegre: Editora Sulina; 1989. 323p.

GUINTER, O.G. Equine pregnancy: Physical interaction between the uterus and conceptus. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 44.1998. **Proceedings...** p.73-104.

HAHNEMANN, N., SORENSON, S.A. Studies on alkaline phosphatase in amniotic in fluid. **Acta Obstet. Gynaecol. Scand.**, v.53, p.15-22, 1974.

JONKER, F.H Fetal deaph: comparative in large domestic animals. **An. Repr. Sci.**, v. 82-83 p. 415-430, 2004.

KANEKO, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5 ed., San Diego: Academic Press, 1997, p.117-138.

KOCHHAR, H.P.S., SIMRAN, P.S., NANDA, A.S., KAUR, R. Comparative biochemical indices of fetal fluids in normal foaling and stressful delivery in Indian Thoroughbred. **J. Equine Vet. Sci.**, v.17, n. 4, p.206-210, 1997.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Reconhecimento materno do conceito e início da placentação. In: PRESTES,N.C., LANDIM-AVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. p.22-40.

LANE, H.D. **Antibories a Laboratory Manual**. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

LEIBO, S.P., RALL, W.F. Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. **Theriogenology**, v.33, p.531-553, 1990.

LEISER, R., KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.102, p.122-134, 1994.

LI, N., WELLS, D.N., PETERSON, A.J., LE, R.S.F. Peturbations in the biochemical composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer pregnancies in the first half of gestation. **Biol. Reprod.**, v.73, p.139-148, 2005.

LINDBERG, A., NISKANEN, R., GUSTAFSSON, H., BENGTON, B., BAULE, C., BELÁK, S., ALENIUS, S. Prenatal diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea vírus (BVDV) infection by detection of viral RNA in fetal fluids. **Vet. J.**, v.164, p.151-155, 2002.

LOVELL, K.L., SPRECHER, D.J., AMES, N.K., JONES, M.Z. Development and efficacy of ultrasound-guided fetal fluid aspiration techniques for prenatal diagnosis of caprine β -mannosidosis. **Theriogenology**, v.44, p.517-527, 1995.

LUMBERS, E.R., SMITH, F.G., STEVENS, A.D. Measurement of net transplacental transfer of fluid to the fetal sheep. **J. Physiol.**, v. 364, p.289-99, 1985.

LYLE, S.K., PACCAMONTI, D.L., HUBERT, J.D., SCHLAFFER, D.H., CAUSEY, R.C., EILTS, B.E., JOHNSON, J.R. Laparoscopic placement of an indwelling allantoic catheter in the mare: Biochemical cytologic, histologic, and microbiologic findings. **An. Reprod. Sci.**, v.94, p.428-431, 2006.

MAESTRI, D., SANSAVERINO, M.T.V., CHEINQUER, N., CORREIA, M.C.M., KESSLER, R.G., AZEVEDO MAGALHÃES, J.A. Alfafetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v.44, n.4, p.273-276, 1998.

MARTÍNEZ, V., JIMÉNEZ, M., SCHOSINSKY, K. Comparación de la determinación enzimática de fosfolípidos que contienen colina con tres pruebas para evaluar madurez pulmonar fetal. **Rev. Costarric. Cienc. Med.**, v.20, n.1-2, p.51-65, 1999.

McDOUGALL, E.I. The composition of foetal fluids of sheep at different stages of gestation. **Biochim. J.**, v.45, p.397-400, 1949.

MELLOR, D.J., SLATER, J.S. Variation in the distribution of glucose and fructose within chronically catheterized sheep conceptuses during the last two months of pregnancy. **Res. Vet. Sci.**, v.15, p.317-321, 1973.

MOYA, C.F., PRESTES, N.C., PIAGENTINI, M., ROCHA, N.S. Amniotic fluid cytology at parturition from Nelore calves conceived by artificial insemination embryo transfer, or in vitro production. **An. Reprod.**, v.3, p.391-395, 2006.

MURCHIE, T.A., MACPHERSON, M., LeBLANC, M.M., LUZNAR, S., VICKROY, T.W. A microdialysis model to detect drugs in the allantoic fluid of pregnant pony mares. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 49. 2003. **Proceedings...**

PRESTES, N.C. Os líquidos fetais e sua constituição bioquímica. In: PRESTES, N.C., LANDIM-AVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. p.41-51.

PRESTES, N.C., CHALHOUB, M.C.L., LOPES, M.D., TAKAHIRA, R.K. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. **Small Rum. Res.**, v.39, p.277-281, 2001.

QUINN, B. A. HAYES, M. A. WAELECHI, R.O. BETTERIDGE, K.J. Major proteins in the embryonic capsule, and in yolk-sac and uterine fluids, during the second to fourth weeks of pregnancy in the mare. In: HAVEMEYER FOUNDATION MONOGRAPH SERIES. 16. 2004. **Proceedings...** p.47-49.

RENAUDIN, C. D. *et al.*, Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. **Theriogenology**, v.47, n. 2, p. 559-573, 1997.

RODRIGUES, V., TONIOLO, G.H., LOPES, J.A., OLIVEIRA, J.A., OLIVEIRA, C.A., PINTO, M.L. Teores séricos do cortisol em cadelas submetidas à cesariana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 17, 2007, Curitiba, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2007, p.30.

SCHMIDT, A.R. WILIANS, M.A., CARLETON, C.L., DARIEN, B.J., DERKSEN, F.J. Evaluation of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis in the late gestational mare. **Eq. Vet. J.**, 23, n. 4, p 261-165, 1991.

SEPULVEDA, W., DONALDSON, A., JONSON, R.D., DAVIES, G., FISK, N.M. Are routine alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase determinations still necessary at second-trimester amniocentesis? Impact of high-resolution ultrasonography. **Obstet. Gynecol.**, v.83, n.1, p.107-112, 1995.

SMITH, K.M., LAI, P.C., ROBERTSON, H.A., CRURCH, R.B., LORSCHIEDER, F.L. Distribution of alpha 1-fetoprotein in fetal plasma, allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.57, n.1, p.235-238, 1979.

SMITH, K.C., McGLADDERY, A.J., BINNS, M.M., MUMFORD, J.A. Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in útero. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p.997-1002, 1997.

STOUT, T.A.E., TREMOLEDA, J.L., THARASANIT, T., COLENBRANDER, B. Formation of the equine blastocyst capsule. Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III, **Havemeyer Foundation Monograph Series**. n.16, p. 62-63.

TROEDSOM, M. SAGE, A. M. Fetal/placental evaluation in the mare. **International Veterinary Information Service**. Disponível em <http://www.ivis.org> acesso em 17 de nov. 2007.

VAALA, W. E. Peripartum asphyxia syndrome in foals. . In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 45. 1999. **Proceedings...** p.247-253.

VINCE, K. J. *et al.*, Ultrasonographic appearance of fetal fluids between 55 and 176 days of gestation in the mare: effect of mare reproductive loss syndrome. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 48. 2002. **Proceedings...** p. 350-352.

WILLIAMS, M. A. et al. Amniotic fluid analysis for ante-partum foetal assessment in the horse. **Eq. Vet. J.**, v. 24. n.3, p.236-238, 1992.

WILLIAMS, M. A. et al., Biochemical characteristics of amniotic and allantoic fluid in late gestational mares. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1251-1257, 1993.

ZEPPERITZ, H., GRÜN, E. Administration of vitamin D, metabolites to dairy cows in late lactation on maternal-fetal mineral metabolism. 2. Influence on mineral content of amniotic and allantoic fluid (in German). In: **Mengen- und Spurenelemente**. 11 Arbeitslagung: Leipzig, 12-13 December 1991, p.78-86.

