

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Identificação de Marcadores Bioquímicos e
Proteínas de Fase Aguda no Líquido Amniótico de
Éguas no Momento do Parto**

Ilusca Sampaio Finger

Pelotas, 2014

ILUSCA SAMPAIO FINGER

**Identificação de Marcadores Bioquímicos e Proteínas de Fase Aguda no
Líquido Amniótico de Éguas no Momento do Parto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências veterinárias.

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Co-Orientadora: Dra. Bruna da Rosa Curcio

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F498i Finger, Ilusca Sampaio

Identificação de marcadores bioquímicos e proteínas de fase aguda no líquido amniótico de éguas no momento do parto / Ilusca Sampaio Finger ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, orientador ; Bruna da Rosa Curcio, coorientador. — Pelotas, 2014.

32 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Gestação. 2. Eletrólitos. 3. Proteinograma. 4. Albumina. 5. Transferrina. I. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, orient. II. Curcio, Bruna da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Bruna da Rosa Curcio

Prof. Dr. Augusto Schneider

Prof. Dr. Charles Ferreira Martins

Agradecimentos

À Deus, por me levar aonde a Sua graça esta para me proteger.

À minha família, por demonstrar que entre nós deve reinar a confiança, a fidelidade, o respeito mútuo, para que o amor se fortifique e nos una cada vez mais. Sem vocês eu não saberia o significado de permanecer em perfeita união, um para o outro e todos para Deus e que nossas conquistas devem ser edificadas em cima de valores humanos e cristãos.

Aos amigos de Itaqui, apesar da distância estão sempre juntos a mim, em meu coração.

Às amigas do meu grupo do EMAÚS Pelotas – FIAT, que unidas em Cristo, são meus exemplos de que um amigo ama em todos os momentos.

Aos colegas da clínica Albeitar e Millie Marchiori, pela amizade, apoio e oportunidades de aprendizado.

As famílias Bálamo Espinosa e Cremonti, sempre me recebendo de braços abertos em suas casas neste período em Pelotas, como duas verdadeiras famílias.

Ao meu orientador, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, pela paciência e ensinamentos desde o período de graduação, um verdadeiro mestre.

À minha co-orientadora, Bruna da Rosa Curcio, pelo empenho, dedicação e incentivo em meu caminho acadêmico.

À todo o grupo de trabalho ClinEq, ao Prof. Charles e todos as outras pessoas que juntas se esforçaram para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Carlos meu namorado, pela cumplicidade e companheirismo.

Resumo

FINGER, Ilusca Sampaio. **Identificação de marcadores bioquímicos e proteínas de fase aguda no líquido amniótico de éguas no momento do parto.** 2014. 32f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A análise do líquido amniótico é útil para compreender o processo bioquímico que envolve a unidade feto-placentária. O objetivo do presente estudo foi identificar marcadores bioquímicos e proteínas da fase aguda no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto. A coleta do líquido amniótico foi realizada pelo método de amniocentese, assim que exposta a bolsa amniótica na primeira fase do parto, através de punção direta. Foram utilizadas quarenta éguas gestantes, entre 5 e 21 anos de idade, da raça Puro Sangue Inglês, na região Sul do Brasil. A composição bioquímica foi avaliada empregando-se kits comerciais e o proteinograma pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Os resultados obtidos de média e erro padrão da média para os componentes bioquímicos foram: pH $7,70 \pm 0,02$, glicose $1,22 \pm 0,08$ (mg/dL), fosfatase alcalina $30,45 \pm 2,67$ (UI/L), gama-GT $4,66 \pm 0,62$ (UI/L), uréia $33,59 \pm 2,34$ (mg/dL), creatinina $5,10 \pm 0,59$ (mg/dL), sódio $54,35 \pm 2,51$ (mEq/L), potássio $1,71 \pm 0,12$ (mEq/L), cloretos $72,09 \pm 5,94$ (mEq/L), cálcio $3,86 \pm 0,23$ (mg/dL), osmolaridade $277,32 \pm 17,76$ (mOsm/L) e proteína total $26,04 \pm 4,39$ (mg/dL). A osmolaridade apresentou correlação com os íons sódio ($R=0,60$), potássio ($R=0,55$) e cálcio ($R=0,53$). Foram detectadas vinte e duas proteínas da fase aguda, sendo que as proteínas inflamatórias albumina e transferrina foram identificadas em mais de 97% das éguas avaliadas. Foi possível a identificação de marcadores bioquímicos e proteínas inflamatórias no líquido amniótico de éguas saudáveis a termo. Somente a transferrina apresentou-se diferente entre os grupos de idade, com concentrações inferiores no grupo de éguas mais velhas.

Palavras-chave: Gestação. Eletrólitos. Proteinograma. Albumina. Transferrina.

Abstract

FINGER, Ilusca Sampaio. **Identificação de marcadores bioquímicos e proteínas de fase aguda no líquido amniótico de éguas no momento do parto.** 2014. 32f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The analysis of amniotic fluid is useful for understanding the biochemical process involving the fetal-placental unit. The aim of this study was to evaluate biochemical profile and acute phase proteins in the amniotic fluid of healthy mares during labor. The collection of amniotic fluid was performed by amniocentesis method, once exposed to the amniotic sac in the first stage of labor, by direct puncture. It has been observed forty Thoroughbred pregnant mares in Southern Brazil. The biochemical composition was evaluated using commercially kits and proteinogram was measured by electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS – PAGE). The results of mean and standard error were: pH 7.70 ± 0.02 ; glucose 1.22 ± 0.08 ; alkaline phosphatase 30.45 ± 2.67 (IU/L); gamma – GT 4.6 ± 0.62 (IU/L), urea 3.59 ± 2.34 (mg/dL), creatinine 5.10 ± 0.59 (mg/dL), sodium 54.35 ± 2.51 (mEq/L); potassium 1.71 ± 0.12 (mEq/L), chloride 72.09 ± 5.94 (mEq/L); calcium 3.86 ± 0.23 (mg/dL); osmolarity 277.32 ± 17.76 (mOsm/L) and total protein 26.04 ± 4.39 (mg/dL). The osmolarity was correlated with ions sodium ($R=0.60$), potassium ($R=0.55$) and calcium ($R=0.53$). Twenty-two acute phase proteins were detected and that inflammatory proteins albumin and transferrin have been identified in more than 97% of the evaluated mares. It was possible to identify biochemical markers and inflammatory proteins in the amniotic fluid of healthy full term mares. Only the transferrin presented among different age groups, with lower concentrations in the older group of mares.

Keywords: Gestation. Electrolytes. Proteinogram. Albumin. Transferrin.

Lista de Tabelas

ARTIGO 1 Perfil Bioquímico e Proteínas de Fase Aguda no Líquido Amniótico de Éguas Saudáveis

Tabela 1 Média, Erro Padrão (S.E), Valores Mínimo e Máximo das variáveis analisadas no líquido amniótico no momento do parto (N=31).....22

Tabela 2 Média, Erro Padrão das Concentrações, Valores Mínimo e Máximo do Peso Molecular das proteínas identificadas no líquido amniótico no momento do parto (N= 36).23

Lista de Abreviaturas

Da - Dálton

Gama – GT - Gama Glutamil Transferase

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

kDa - Kilo Dálton

Mcal - Mega Calorias

mEq/L - Mili Equivalente por litro

mg/dL - Miligramas por decilitro

MHz - Megahertz

mL - Mililitro

mm - Milimetro

mOsm/L - Miliosmol por litro

pH - Potencial hidrogeniônico

UI/L - Unidade internacional por litro

Sumário

1 Introdução	10
2 Objetivos	13
3 Artigo	14
4 Conclusão geral	30
5 Referências	31

1 INTRODUÇÃO

A região sul do Brasil concentra grande parte da criação de equinos da raça Puro Sanguê Inglês do país, desta forma, é importante o reconhecimento dos principais problemas que comprometem esta criação. Assim como o desenvolvimento de ferramentas que aumentem a produtividade da atividade. Sendo que qualquer distúrbio ocorrido durante a gestação, no peri-parto ou no período neonatal pode resultar no comprometimento da saúde do potro, ocasionando prejuízos aos criadores.

As condições que contribuem para perdas em gestações avançadas incluem agentes infecciosos, anormalidades fetais ou placentárias, anormalidades estruturais e doenças sistêmicas da gestante (MACPHERSON, 2007). A unidade útero-placentária pode ser comprometida por processos de hipoxemia ou infecção, o que interfere na difusão entre as circulações materna e fetal, reduzindo o aporte de nutrientes e oxigênio para o feto e placenta. Em resposta a este processo, ocorre um estresse fetal que pode dar origem a um retardo no crescimento intra-uterino – IUGR (ROSSDALE, 2004). O IUGR é definido como o nascimento de um indivíduo com o peso até 10% abaixo do considerado normal para a população de acordo com o tempo de gestação (KITCHEN, 1968), e resulta de danos celulares e alterações endócrinas, metabólicas e da função cardiovascular. De acordo com a verdade destas alterações podem ocorrer morte fetal, aborto ou prematuridade (ROSSDALE, 2004). A causa mais frequente de perda de gestação está associada a placentite que, em éguas, é normalmente causada por infecção ascendente via cervical. A Placentite ascendente é a principal causa de parto prematuro em éguas, representa mais de 30% dos partos prematuros e mortes neonatais dentro das primeiras 24h de vida (MCKINNON, 2009).

Com a avaliação obstétrica da égua durante a gestação e no pós-parto, torna-se possível reconhecer fatores que comprometem a gestação e a viabilidade do feto e do neonato. Desta forma, é possível intervir na égua ou no potro precocemente ao aparecimento de condição clínica.

O embrião equino se torna um blastocisto logo após migrar para o cório uterino. Neste momento o embrião encontra-se no estágio de mórula ou blastocisto inicial. As células do embrião compactado se dividem para formar uma mórula de 32 células, a qual se caracteriza por apresentar um pequeno grupo de células no interior da estrutura rodeada externamente por outro grupo de células. Estas células, localizadas externamente formarão o trofoblasto. O qual posteriormente originará o córion, que permanece como o contato da placenta com o endométrio durante a gestação (GUINTER, 1998). O âmnio é formado a partir de dobras do trofoblasto, sendo constituído por dois folhetos, entre eles há o espaço amniótico, contendo o líquido amniótico (ASBURY; LeBLANC. 1993).

O líquido amniótico reflete o estado materno fetal tanto por sua composição como pelo seu volume, tendo importância na boa evolução da gestação (DERTKIGIL et al., 2005). A análise deste fluido fetal é utilizada para compreender o processo bioquímico que envolve a unidade feto-placentária, sendo possível avaliar a viabilidade fetal.

Em equinos existem poucos trabalhos sobre o tema, contudo já foi demonstrado que a variação na concentração dos componentes bioquímicos do fluido amniótico pode ter uma relação significativa com a saúde fetal, podendo indicar certas enfermidades (KOCHHAR et al., 1997). Em éguas da raça Puro Sangue Inglês, a osmolaridade apresentou uma correlação positiva com a idade da parturiente, e enzimas e eletrólitos do líquido amniótico (CURCIO et al., 2012). Em estudo realizado por Zanella et al. (2013) os autores identificaram que em éguas, de acordo com o período gestacional, há uma variação na composição bioquímica tanto do líquido amniótico quanto do líquido alantóide. A concentração de lactato no fluido amniótico foi avaliada no momento do parto em éguas, podendo ser útil na identificação dos neonatos que necessitam de intervenção precoce, logo após o nascimento (PIRRONE et al., 2012). Mais estudos devem ser desenvolvidos para que o líquido amniótico possa ser uma eficiente ferramenta na rotina clínica de equinos.

Um grande desafio na medicina envolve a detecção e monitoramento da inflamação, a qual resulta de diversas enfermidades (CRISMAN, 2008). Na busca de marcadores precoces da inflamação e processos infecciosos em equinos, pesquisas com proteínas da fase aguda da inflamação estão sendo desenvolvidas também na espécie equina (GARRY et al., 1996, HULTÉN et al., 1999). Com o estabelecimento de pesquisas nessa área, as proteínas de fase aguda são cada vez mais utilizadas no diagnóstico e prognóstico nas doenças dos animais domésticos (CANISSO et al., 2014). Em resposta a infecção ou injúria, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações são diretamente relacionadas com a severidade da condição inflamatória do animal (CRISMAN, 2008).

A avaliação do líquido amniótico no momento do parto é um método pouco invasivo e ágil capaz de demonstrar processos de comprometimento da placenta e feto. Poucos são os estudos clínicos desenvolvidos em líquido amniótico de equino e não há relatos na literatura da realização de proteinograma em fluidos fetais. Desta forma, se faz necessária a identificação de marcadores bioquímicos e proteínas de fase aguda no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto, sendo este o objetivo explorado nesta dissertação.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é identificar marcadores bioquímicos e proteínas de fase aguda no líquido amniótico em éguas saudáveis no momento do parto.

Objetivo Específico

- Realizar proteinograma do líquido amniótico no momento do parto em éguas saudáveis.
- Determinar as concentrações de eletrólitos e enzimas presentes no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto.

3 ARTIGO

PERFIL BIOQUÍMICO E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO AMNIÓTICO DE ÉGUAS SAUDÁVEIS

I.S. Finger; B. R. Curcio; C. Haetinger; L.S. Feijó; F.M. Pazinato; N.C. Prestes;
C.E.W. Nogueira.

Submetido à revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*

Artigo

PERFIL BIOQUÍMICO E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO
AMNIÓTICO DE ÉGUAS SAUDÁVEIS

BIOCHEMICAL PROFILE AND ACUTE PHASE PROTEIN OF AMNIOTIC FLUID
IN HEALTHY MARES

I.S. Finger^{I*}; B. R. Curcio^{III}; C. Haetinger^I; L.S. Feijó^I; F.M. Pazinato^I; N.C. Prestes^{II};
C.E.W. Nogueira^{III}.

^IPós – Graduanda, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

^{II}Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Botucatu, SP

^{III}Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

*ilusca-finger@hotmail.com

RESUMO

A análise do líquido amniótico é útil para compreender o processo bioquímico que envolve a unidade feto-placentária. O objetivo do presente estudo foi identificar marcadores bioquímicos e proteínas da fase aguda no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto. A coleta do líquido amniótico foi realizada pelo método de amniocentese, assim que exposta a bolsa amniótica na primeira fase do parto, através de punção direta. Foram utilizadas quarenta éguas gestantes, entre 5 e 21 anos de idade, da raça Puro Sangue Inglês, na região Sul do Brasil. A composição bioquímica foi avaliada empregando-se kits comerciais e o proteinograma pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Os resultados obtidos de média e erro padrão da média para os componentes bioquímicos foram: pH $7,70 \pm 0,02$, glicose $1,22 \pm 0,08$ (mg/dL), fosfatase alcalina $30,45 \pm 2,67$ (UI/L), gamma – GT $4,66 \pm 0,62$ (UI/L), uréia $33,59 \pm 2,34$ (mg/dL), creatinina $5,10 \pm 0,59$ (mg/dL), sódio $54,35 \pm 2,51$ (mEq/L), potássio $1,71 \pm 0,12$ (mEq/L), cloretos $72,09 \pm 5,94$ (mEq/L), cálcio $3,86 \pm 0,23$ (mg/dL), osmolaridade $277,32 \pm 17,76$ (mOsm/L) e proteína total $26,04 \pm 4,39$ (mg/dL). A osmolaridade apresentou correlação com os íons sódio ($R=0,60$), potássio ($R=0,55$) e cálcio ($R=0,53$). Foram detectadas vinte e duas proteínas de fase aguda, sendo que as proteínas inflamatórias albumina e transferrina foram identificadas em mais de 97% das éguas avaliadas. Foi possível a identificação de marcadores bioquímicos e proteínas inflamatórias no líquido amniótico de éguas saudáveis a termo. Somente a transferrina apresentou-se diferente entre os grupos de idade, com concentrações inferiores no grupo de éguas mais velhas.

Palavras-chave: Gestação, Eletrólitos, Proteinograma, Albumina, Tranferrina.

ABSTRACT

The analysis of amniotic fluid is useful for understanding the biochemical process involving the fetal-placental unit. The aim of this study was to evaluate biochemical profile and acute phase proteins in the amniotic fluid of healthy mares during labor. The collection of amniotic fluid was performed by amniocentesis method, once exposed to the amniotic sac in the first stage of labor, by direct puncture. It has been observed forty Thoroughbred pregnant mares in Southern Brazil. The biochemical composition was evaluated using commercially kits and proteinogram was measured by eletrophoresis in poliacrylamide gel (SDS – PAGE). The results of mean and standard error were: pH 7.70 ± 0.02 ; glucose 1.22 ± 0.08 ; alkaline phosphatase 30.45 ± 2.67 (IU/L); gamma – GT 4.6 ± 0.62 (IU/L), urea 33.59 ± 2.34 (mg/dL), creatinine 5.10 ± 0.59 (mg/dL), sodium 54.35 ± 2.51 (mEq/L); potassium 1.71 ± 0.12 (mEq/L), chloride 72.09 ± 5.94 (mEq/L); calcium 3.86 ± 0.23 (mg/dL); osmolarity 277.32 ± 17.76 (mOsm/L) and total protein 26.04 ± 4.39 (mg/dL). The osmolarity was correlated with ions sodium ($R=0.60$), potassium ($R=0.55$) and calcium ($R=0.53$). Twenty-two acute phase protein were detected and that inflammatory proteins albumin and transferrin have been identified in more than 97% of the evaluated mares. It was possible to identify biochemical markers and inflammatory proteins in the amniotic fluid of healthy full term mares. Only the transferrin presented among different age groups, with lower concentrations in the older group of mares.

Keywords: Gestation, Electrolytes, Proteinogram, Albumin, Transferrin.

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 (Baetz *et al.*, 1976). 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 (Guinter, 1998; Prestes, 2006). Neste contexto, o líquido amniótico desempenha papel fundamental na gestação como no parto das éguas (Zanella *et al.*, 2013).

A unidade útero-placentária pode ser comprometida por processos de hipoxemia ou infecção, o que interfere na difusão entre as circulações materna e fetal, reduzindo o aporte de nutrientes e oxigênio para o feto e a placenta (Rossdale, 2004). O líquido amniótico reflete o estado materno fetal tanto por sua composição como pelo seu volume, tendo importância na boa evolução da gestação (Dertkigil *et al.*, 2005). Em equinos existem poucos trabalhos sobre o tema, contudo já foi demonstrado que a variação na concentração dos componentes bioquímicos do fluido amniótico pode ter uma relação significativa com a saúde fetal, podendo indicar certas enfermidades (Kochhar *et al.*, 1997). Em éguas da raça Puro Sangue Inglês, a osmolaridade apresentou uma correlação positiva com a idade da parturiente, enzimas e eletrólitos do líquido amniótico (Curcio *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Zanella *et al.* (2013) os autores identificaram que em éguas, de acordo com o período gestacional, há uma variação na composição bioquímica tanto do líquido amniótico quanto do líquido alantóide. A concentração de lactato no fluido amniótico foi avaliada no momento do parto em éguas, podendo ser útil na identificação dos neonatos que necessitam de intervenção precoce, logo após o nascimento (Pirrone *et al.*, 2012). Mais estudos devem ser desenvolvidos para que o líquido amniótico possa ser uma eficiente ferramenta na rotina clínica de equinos.

Um grande desafio na medicina envolve a detecção e monitoramento da inflamação, a qual resulta de diversas enfermidades (Crisman, 2008). Com o estabelecimento de pesquisas nessa área, as proteínas de fase aguda são cada vez mais

utilizadas no diagnóstico e prognóstico nas doenças dos animais domésticos (Canisso *et al.*, 2014). Em resposta a infecção ou injúria, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações são diretamente relacionadas com a severidade da condição inflamatória do animal (Crisman, 2008).

A avaliação do líquido amniótico no momento do parto é um método pouco invasivo e ágil capaz de demonstrar processos de comprometimento da placenta e feto. Poucos são os estudos clínicos desenvolvidos em líquido amniótico de equino e não há relatos na literatura da realização de proteinograma em fluidos fetais. Desta forma, o objetivo deste estudo é identificar marcadores bioquímicos e proteínas da fase aguda no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Este estudo foi realizado em um criatório de cavalos da Raça Puro Sangue Inglês, localizado no município de Bagé, sul do Brasil, latitude 31°34'48.54" e longitude 54°11'06.38". Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas, sob o número de protocolo 23110.005008/2013-43.

As éguas eram mantidas durante o verão em campo nativo e durante o inverno a consorciação de azevém (*Lolium multiflorum*), trevo branco (*Trifolium repens*) e cornichão (*Lotus corniculatus*) como pastagem cultivada. A suplementação era realizada através de ração balanceada com garantia de 12% de proteína e 27,5% Mcal de energia digerível. A água estava disponível *ad libitum*.

Foram utilizadas quarenta éguas gestantes, saudáveis, entre 5 e 21 anos de idade, apresentando o mesmo padrão de escore corporal. As éguas foram divididas em dois grupos de acordo com Madill (2002): o grupo 1 (n= 19), éguas jovens, com idades entre cinco e oito anos ($6,8 \pm 0,32$) e o grupo 2 (n= 21), éguas com idade superior a nove anos ($13,1 \pm 0,85$).

As éguas foram monitoradas durante todo o período gestacional por médico veterinário. Mensalmente eram submetidas a exames de palpação retal e ultrassonográficos para avaliação do feto e da placenta. A partir do 5º mês de gestação

realizava-se a medição da espessura da junção útero-placentária via transretal utilizando transdutor linear de 5 MHz, conforme descrito Renaudin *et al.* (1997).

Trinta dias antes da data de previsão do parto as éguas eram direcionadas para o lote de parição e mantidas soltas a campo sob vigilância contínua até iniciar o parto. O tempo médio de gestação foi de $345,8 \pm 1,9$ dias. Após o rompimento da bolsa alantoideana e exposição da membrana amniótica eram conduzidas às cocheiras maternidade para que todos os partos fossem assistidos. Todos os partos foram eutócicos com o nascimento de potros viáveis.

As placentas foram inspecionadas e pesadas imediatamente após a expulsão. O peso médio das placentas foi de $6,7 \pm 0,2$ Kg. Para avaliação macroscópica, as placentas foram dispostas em formato de “F”, conforme descrito por Schlafer (2004). Foram coletados fragmentos de sete pontos para avaliação histopatológica, sendo estes correspondentes a estrela cervical, corpo uterino, corno gravídico e não gravídico, bifurcação, âmnio e cordão umbilical, estes foram armazenados em tubos Falcon® de 50mL acrescidos de solução de formalina tamponada a 10% para fixação e posterior avaliação microscópica. Todas as éguas utilizadas neste estudo apresentaram padrão histopatológicas das placentas sem alteração, de acordo com a avaliação descrita por Lins *et al.* (2012).

Coleta de material

A coleta do líquido amniótico foi realizada através de punção direta da vesícula amniótica, com seringa de 20mL e agulha (40x12 mm) estéril (método de amniocentese), assim que exposta a bolsa amniótica na primeira fase do parto.

O material foi imediatamente transferido para tubos falcon® de 15 mL e estocado em freezer sob temperatura de - 20°C para posterior avaliação.

Análise Bioquímica do Líquido Amniótico

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de patologia clínica da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, similar ao descrito por Zanella *et al.* (2013). Foram avaliados pH, glicose, fosfatase alcalina, gamma – GT, uréia, creatinina, sódio, potássio, cloretos, cálcio, osmolaridade e proteína total. A quantificação foi realizada com espectrofotômetro, SB – 190 Celm (Companhia

Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, São Paulo, SP, Brasil), para todos os elementos, exceto sódio e potássio através do equipamento CELM FC – 280 fotômetro de chama (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos). Para quantificar os níveis de creatinina, uréia e cloretos foi utilizado kit CELM (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos) de acordo com as instruções do fabricante.

Proteinograma

O proteinograma do líquido amniótico foi obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - FCAV - UNESP, Jaboticabal, conforme método descrito por Laemmli (1970) e as recomendações de Fagliari e Silva (2002). Após o fracionamento, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de coomassie; em seguida, foi descorado em solução de metanol e ácido acético. Os pesos moleculares e as concentrações das proteínas foram determinadas mediante leitura em densitômetro computadorizado (Densitometer CS9301- PC - Shimadzu, Tokyo-Japan). Para a identificação das proteínas no gel, foi utilizada solução marcadora (Sigma Marker, Wide Range – Saint Louis, USA) com diversos pesos moleculares, variando de 20.000 a 200.000 daltons.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistix8.0® (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Todos os valores bioquímicos e proteínas de fase aguda foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Os dados foram submetidos a teste de normalidade Shapiro Wilk. Foi realizado para todas as variáveis respostas o teste de correlação de Pearson. As comparações entre as médias das proteínas de fase aguda entre os grupos foram realizadas pelo teste Two Sample T Test. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os índices de éguas que apresentaram proteínas inflamatórias entre os grupos de idade.

RESULTADOS

Não foi observada correlação entre as proteínas inflamatórias identificadas no líquido amniótico. No entanto, nas análises bioquímicas foi possível observar que a osmolaridade apresentou correlação positiva com sódio ($R = 0.60$, $p = 0,0001$), potássio ($R = 0.55$, $P = 0,0004$) e cálcio ($R = 0.53$, $P = 0,0007$).

Os resultados das análises bioquímicas realizadas no líquido amniótico das éguas no momento do parto estão apresentados na Tab. 1.

Tabela 1. Média, Erro Padrão (S.E), Valores Mínimo – Máximo das variáveis analisadas no líquido amniótico no momento do parto (N=31).

Variável	Média±S.E	Valores Mínimo – Máximo
pH	7,70±0,02	7,42 – 7,97
Glicose (mg/dL)	1,22±0,08	1,0 – 3,0
Fosfatase Alcalina (UI/L)	30,45±2,67	8,0 – 95
Gamma – GT (UI/L)	4,66±0,62	1,80 – 16,4
Uréia (mg/dL)	33,59±2,34	6,80 – 61,8
Creatinina (mg/dL)	5,10±0,59	2,0 – 17,3
Sódio (mEq/L)	54,35±2,51	31 – 89
Potássio (mEq/L)	1,71±0,12	0,9 – 3,5
Cloretos (mEq/L)	72,09±5,94	47 – 239
Cálcio (mg/dL)	3,86±0,23	1,8 – 6,47
Osmolaridade (mOsm/L)	277,32±17,76	143 – 633
Proteína Total (mg/dL)	26,04±4,39	9,23 – 139,07

No traçado densitométrico foram detectadas no líquido amniótico vinte e duas proteínas com pesos moleculares variando 19.439 a 272.284 dáltons (Da). Destas, dez proteínas foram consideradas para o estudo, por serem imunoglobulinas e proteínas de fase aguda. Assim nas 36 éguas utilizadas para essa análise, destacaram-se com respectiva percentagem no fluido amniótico a albumina (n=36; 100%), transferrina

(n=35; 97,22%), IgG cadeia leve (n=33; 91,7%), IgG cadeia pesada (n=30; 83,33%), IgA (n=30; 83,3%), haptoglobina (n=22; 61,11%), ceruloplasmina (n=21; 58,3%), α_1 - antitripsina (n=13; 36,11%), α_1 - glicoproteína ácida (n=7; 20%) e 23 kDa (n=2; 5,6%). As concentrações destas dez proteínas, apresentadas pela média, juntamente com seus respectivos erros padrões, valores mínimos e máximos dos pesos moleculares, encontram-se na Tab. 2. Na comparação entre os grupos de idade, não foi observada diferença na porcentagem de éguas em que foram identificadas as proteínas inflamatórias. Na avaliação da concentração das proteínas entre os grupos, somente a transferrina apresentou diferença ($p=0.01$), sendo detectadas médias superiores no grupo de éguas jovens ($47,8 \pm 14,2$) em relação às éguas mais velhas ($10,3 \pm 3,7$).

Tabela 2. Média, Erro Padrão das Concentrações, Valores Mínimo e Máximo do Peso Molecular das proteínas identificadas no líquido amniótico no momento do parto (N=36).

Proteínas de Fase		N	Média $\pm$ S.E	Valores
Aguda	(mg/dL)			Mínimo-Máximo (Da)
Albumina		36	177,01 $\pm$ 30,58	63,74 – 69,76
Transferrina		35	37,98 $\pm$ 9,47	80,53 – 89,32
IgG Cadeia Leve		33	148,99 $\pm$ 39,90	23,80 – 40,60
IgG Cadeia Pesada		30	10,43 $\pm$ 2,63	23,88 – 61,72
IgA		30	1,10 $\pm$ 0,51	151,54 – 194,12
Haptoglobina		22	17,47 $\pm$ 12,88	40,70 – 56,97
Ceruloplasmina		21	0,39 $\pm$ 0,10	93,40 – 120,40
α_1 - Antitripsina		13	15,21 $\pm$ 9,10	59,41 – 64,30
α_1 - glicoproteína ácida		7	0,24 $\pm$ 0,08	33,86 – 41,40
23 kDa		2	7,50 $\pm$ 3,35	23,30 – 23,42

DISCUSSÃO

Este estudo determinou componentes bioquímicos em todas as amostras de líquido amniótico obtidas no momento do parto. A unidade feto-placentária é um sistema dinâmico, o qual realiza trocas constantes entre a circulação materna e os fluidos fetais, sendo que a variação nas concentrações desses componentes pode ter uma relação significativa com a saúde fetal (Kochhar *et al.*, 1997).

O valor médio encontrado para o pH foi de 7,70. A discreta alcalinidade demonstrada para o valor do pH pode estar relacionada a presença dos eletrólitos, contudo não foi encontrada correlação entre eles. Em equinos não existem valores identificados de pH do líquido amniótico no momento do parto. Em estudo realizado por Martins (2004) o pH identificado no líquido amniótico de cadelas variou de 7,50 a 8,50. Em estudo realizado em ovelhas por Prestes *et al.* (2001), os autores observaram uma diminuição do pH ao longo da gestação, os autores sugerem que esta diminuição ocorra devido ao aumento de secreções e eliminação de proteínas oromucóides.

A composição eletrolítica do líquido amniótico varia muito e essas trocas refletem a atividade dos rins, pulmões e trato digestório (Gulbis *et al.*, 1998). No presente estudo os níveis de sódio identificados foram inferiores aos valores obtidos nas três fases da gestação por Zanella *et al.* (2013).

De acordo com o estudo realizado por Kochhar *et al.* (1997) há uma elevação na concentração de íons potássio e cálcio no fluido alantóide, sugerindo um aumento da urina e atividade metabólica fetal. Estes eletrólitos demonstraram uma diminuição no líquido amniótico no momento do parto ao comparar com os dados obtidos para o terço final da gestação por Zanella *et al.* (2013).

Em estudo realizado em ovelhas por Prestes *et al.* (2001), os cloretos demonstraram a mesma tendência que o sódio. Em que houve uma diminuição dos níveis ao longo dos terços gestacionais. Zanella *et al.* (2013) observaram um aumento no terço médio e uma redução no terço final da gestação. Em nosso estudo, os níveis dos íons cloretos foram superiores aos valores obtidos por Zanella *et al.* (2013). Através do estudo dos eletrólitos como sódio, potássio e cálcio foi possível demonstrar que estes componentes e suas respectivas variações influenciaram na osmolaridade do líquido amniótico.

O valor médio de 1,22 mg/dL para os níveis de glicose no líquido amniótico no momento do parto foi inferior ao valor de 4.0 mg/dL observado por Zanella *et al.* (2013) no terço final da gestação. Isto demonstra que há uma redução na concentração de glicose de acordo com a evolução da gestação em éguas saudáveis. Em mulheres, a glicose do fluido amniótico é utilizada como um indicador sensível e específico de infecção intra-amniótica (Kirshon *et al.*, 1991). Em estudos com ovelhas (Burd *et al.*, 1975; Carter *et al.*, 1993) os autores demonstraram que a placenta metaboliza rapidamente a glicose, produzindo grande quantidade de lactato como subproduto. A concentração de lactato no líquido amniótico de equinos esta relacionada positivamente com o pH do potro imediatamente após o nascimento, uma vez que um pH baixo pode indicar hipóxia neonatal (Pirrone *et al.*, 2012).

A fosfatase alcalina está correlacionada com maturidade, formação óssea e principalmente, com a função renal fetal (Hahnemann, 1974). Pode ocorrer um aumento da atividade da enzima devido a maturação avançada do intestino, fígado, ossos e rins fetais, a entrada direta de células descamadas da mucosa intestinal no líquido amniótico ou eventual passagem de matéria fecal durante o processo de nascimento (Williams *et al.*, 1993). Os níveis obtidos para esta enzima em nosso trabalho no momento do parto, foram inferiores ao valor obtido por Zanella *et al.* (2013) no terço final da gestação. Sugerindo que com a proximidade do parto, em éguas saudáveis, há uma redução na atividade da fosfatase alcalina.

Em estudo realizado por Prestes *et al.* (2001) foi possível determinar grande concentração da enzima gama – GT nos rins, pâncreas e fígado, participando do metabolismo de vários mediadores de funções fisiológicas. Assim, os valores obtidos para esta enzima no líquido amniótico no momento do parto demonstram a atividade destes órgãos em potros oriundos de éguas gestantes saudáveis.

A concentração média de uréia foi de 33.59, valor este inferior ao valor obtido por Zanella *et al.* (2013), no terço final da gestação. Através destes valores é possível observar uma redução nos níveis de uréia no líquido amniótico no momento do parto.

O aumento na concentração de creatinina no líquido amniótico reflete a maturação do sistema urinário no neonato equino (Williams *et al.*, 1993), uma vez que a creatinina representa um bom marcador de maturação e função renal em humanos (Begnaud *et al.*, 1969). 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 conceito (Lumbers *et al.*, 1985). O estudo realizado em ovelhas sem alterações gestacionais por Prestes *et al.* (2001), comprovou que os valores de creatinina no líquido amniótico aumentaram conforme a evolução da gestação. Para Vaala (1999), o nível de creatinina sérica não é um marcador confiável da função renal dos potros neonatos, porque a placenta é a principal responsável pela eliminação de metabólitos do feto e a elevação da creatinina é geralmente uma consequência de disfunção placentária. Desta forma, o nível obtido de creatinina no líquido amniótico de éguas saudáveis reflete uma adequada função feto-placentária, e um potencial marcador dessa condição.

Em estudos realizados por Canisso *et al.* (2014) e Coutinho *et al.* (2013), os autores demonstraram um aumento nos níveis séricos das proteínas inflamatórias haptoglobina e Amilóide A sérica, em éguas com alterações inflamatórias na placenta. No líquido amniótico de equinos, não há relato da avaliação de proteínas de fase aguda. A albumina demonstrou estar presente em todas (100%) as amostras (177.01 ± 30.58 mg/dL). A proteína identificada com peso molecular de 23 kDa (7.50 ± 3.35 mg/dL) apresentou o menor percentual e foi identificada em apenas duas amostras (5,6%).

A transferrina, proteína de fase aguda negativa, apresentou um valor significativamente inferior no grupo de éguas mais velhas. Apresentando um padrão similar ao descrito sobre as concentrações de albumina, em vacas multíparas, o que pode representar um marcador de processos inflamatórios associados a processos reprodutivos no pós-parto (Krause *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

Foi possível identificar marcadores bioquímicos e proteínas inflamatórias no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto. Somente a transferrina apresentou-se diferente entre os grupos de idade, com concentrações menores no grupo de éguas mais velhas.

REFERÊNCIAS

- BAETZ, A.L.; HUBERT, W.T.; GRAHAM, C.K. Changes of biochemical constituents in Bovine fetal fluids with gestoterial age. *Am J Vet. Res.*, v. 37, 1976.
- BEGNEAUD, W.P.; TRUMAN, P.H.; ABE MICKAL, M.D. et al. Amniotic Fluid Creatinine for Prediction of Fetal Maturity. *Obstetrics and Gynecology.*, v. 34, p. 7-13, 1969.
- BURD, L.I.; JONES, M.D Jr., SIMMONS, M.A. et al. Placental production and fetal utilisation of lactate and pyruvate Placental production and foetal utilization of lactate and pyruvate. *Nature.*, 254:710 –1, 1975.
- CANISSO, I.C.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H. et al. Acute phase proteins and total leukocyte counts in blood of mares with experimentally induced ascending placentitis. *Journal of Equine Veterinary Science.*, v. 34, p. 215, 2014.
- CARTER, B.S.; MOORES, R.R., BATTAGLIA, F.C. et al. Ovine fetal placental lactate exchange and decarboxylation at midgestation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 264:E221–5, 1993.
- COUTINHO DA SILVA, M.A.; CANISSO, I.C.; MACHPHERSON, M.L. et al. Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares qith ascending placentitis. In: *Equine Veterinary Journal.*, p. 1-6, 2013.
- CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K.L.: Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet Clin Equine.*, v. 24, p. 285–297, 2008.
- CURCIO, B.R.; FINGER, I.S.; HAETINGER, C. et al Avaliação da osmolaridade do líquido amniótico em éguas da raça Puro Sangue Inglês – Dados Preliminares. In: *Resumos XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.*, v. 26, p. 595, 2012.
- DERTKIGIL, M.S.; CECATTI, J.G.; CAVALCANTE. et al. Líquido Amniótico, atividade física e imersão em água na gestação. *Ver. Bras. Saúde Mater. Infant.*, v. 5, n. 4, p. 403-410, 2005.
- FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo, antes e após laparotomia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.559-567, 2002.

- 410 GUINTER, O.J. Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and
411 Conceptus. In: *AAEP Proceedings.*, v. 44, p. 73-104, 1998.
- 412 GULBIS, B.; GERVY, C.; JAUNIAUX, E. et al. Amniotic fluid biochemistry in
413 second-trimester trisomic pregnancies: relationships to fetal organ maturation and
414 dysfunction. *Early Human Development.*, v. 52, p. 211-219, 1998.
- 415 HAHNEMANN, N.; SORENSON, S.A. Studies on alkaline phosphatase in amniotic in
416 fluid. *Acta Obstet. Gynaecol. Scand.*, v. 53, p. 15-22, 1974. Janeiro: Guanabara-
417 Koogan, 2006. p.41-51.
- 418 KIRSHON, B.; ROSENFELD, B.; MARI, G. et al. Amniotic fluid glucose and
419 intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 164, p. 828-820, 1991.
- 420 KOCHHAR, H.P.S.; SIMRAN, P.S.; RIPUDAMAN KAUR. Comparative Biochemical
421 indices of fetal fluids in normal foaling and stressful delivery in Indian thoroughbred
422 mares. *Journal of Equine Veterinary.*, v. 17, n. 4, 1997.
- 423 KRAUSE, A.R., PFIFER, L.F.M., MONTAGNER, P. et al. Association between
424 resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of
425 metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows.
426 *Animal Reproduction Science.*, v. 145, p. 8-14, 2014.
- 427 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
428 bacteriophage T₄. *Nature.*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 429 LINS, L.; FINGER, I.S.; FERNANDES, C.G. et al. Resposta clínica e metabólica de
430 potros neonates em relação aos achados histopatológicos da placenta na égua. *Arquivo*
431 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v. 64, p.1436-1441, 2012.
- 432 LUMBERS, E.R.; SMITH, F.G.; STEVENS, A.D. Mensurement of net transplacental
433 transfer of fluid to the fetal sheep. *J. Physiol.*, v. 364, p. 289-99, 1985.
- 434 MADILL, S. Reproductive Considerations: mare and stallion. *Vet. Clin. Equine.*, v. 18,
435 p. 591 – 619, 2002.
- 436 MARTINS, L.R.; PRESTES, N.C.; LOPES, M.D. Análise comparativa dos
437 componentes bioquímicos no líquido amniótico de fetos e soro de cadelas (*Cannis*
438 *familiaris*). *Ars Veterinária, Jaboticabal, SP.* v.20, n. 1, p. 115-122, 2004.
- 439 PIRRONE ,A.; MARIELLA,J.;GENTILINI,F. et al. Amniotic fluid and blood lactate
440 concentrations in mares and foals. *Theriogenology.*, v. 78, p. 1182-1189, 2012.
- 441 PRESTES, N.C. Os líquidos fetais e sua constituicao bioquimica. In:

- 442 PRESTES, N.C., LANDIM-AVARENGA, F.C. Obstetrícia Veterinária. Rio de Janeiro:
443 Guanabara-Koogan, 2006. P. 41-51.
- 444 PRESTES,N.C.; CHALHOUB,M.C.L.; TAKAHIRA,R.K. Amniocentesis and
445 biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy.
446 *Small Ruminant Research.*, v. 39, p. 277-281, 2001.
- 447 RENAUDIN, C.D.; TROEDSSON, M.H.T.; GILLIS, C.L.; *et al.* Ultrasonographic
448 evaluation of the equine placenta By transrectal and transabdominal approach In the
449 normal pregnant mare. *Theriogenology.*, v. 47, p. 559-673, 1997.
- 450 ROSSDALE, P.D. The maladjusted foal: influences of intrauterine growth retardation
451 and birth trauma. In: *AAEP Proceedings.*, v. 50, p. 75-126, 2004.
- 452 SCHLAFER, D.H. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate:
453 Methods and interpretation of findings. In: *AAEP Proceedings.*, v. 50, p. 144-161,
454 2004.
- 455 VAALA, W.E. Peripartum asphyxia syndrome in foals. In: *AAEP Proceedings.*, v. 45,
456 p. 247-253, 1999.
- 457 WILLIAMS, M. A.; WALLACE, S.S.; TYLER, J.W. *et al.* Biochemical characteristics
458 of amniotic and allantoic fluid in late gestational mares. *Theriogenology.*, v. 40, n. 6, p.
459 1251-1257, 1993.
- 460 ZANELLA, L.F.; TAKAHIRA, R.K.; MELO, C.M.; *et al.* Biochemical profile of
461 amniotic and allantoic fluid during different gestational phases in mares. *Journal of*
462 *Equine Veterinary Science.* p.1-4, 2013.

4 CONCLUSÃO GERAL

Poucos são os estudos desenvolvidos em líquido amniótico na espécie equina. Desta forma, a partir dos resultados bioquímicos e o proteinograma apresentados foi possível determinar valores de referência para a análise do líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto. Somente a transferrina apresentou-se diferente entre os grupos de idade, com concentrações inferiores no grupo de éguas mais velhas.

Mais estudos devem ser desenvolvidos para que o líquido amniótico possa ser uma eficiente ferramenta na rotina clínica de equinos.

5 REFERÊNCIAS

ASBURY, A .C., L eBLANC, M .M. T he p lacenta. In : M cKINNON, A .O.,VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. p. 509-516.

CANISSO, I.C .; B ALL,B.A.; TROEDSSON, M .H.; C RAY, C .; DAVOLLI, G.M .; SQUIRES, E.L.; WILLIAMS, N.M. Acute phase proteins and total leukocyte counts in blood of mares with experimentally induced ascending placentitis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 215, 2014.

CRISMAN, M .V.; S CARRATT, W. K .; Z IMMERMANN, K .L.: B lood P roteins and Inflammation in the Horse. **Vet Clin Equine**,v.24, p. 285–297, 2008.

CURCIO, B .R; F INGER, I.S .; H AETINGER,C; F EIJO, L.S; D e V ITTA, B .; PRESTES,N.C; ALVARENGA, F .L; NO GUEIRA,C.E.W. Avaliação da osmolaridade do Líquido amniótico em éguas da raça Puro Sangue Inglês – Dados Preliminares. **Resumos X XVI R eunião Anual da S ociedade B rasileira de T e cnologia de Embriões**, p.595, 2012.

DERTKIGIL, M.S; CECATTI, J.G; CAVALCANTE, S.R; BACIUK, E.P; BERNARDO, A.L. Líquido Amniótico, atividade física e imersão em água na gestação. **Ver. Bras. Saúde Mater.Infant**, v.5, n.4, p.403-410, 2005.

GARRY, D .; F IGUEROA, R .; A GUERO-ROSENFELD, M.; M ARTINEZ, E .; VISINTAINER, P .; TEJANI, N. A comparison of rapid amniotic fluid markers in the prediction of microbial invasion of the uterine cavity and preterm delivery. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.175, p.1336-1341, 1996.

GUINTER, O .J. E quine P regnancy: P hysical I nteractions B etween t he U terus and Conceptus. **Proceedings of the American Association of Equine Practice**, v. 44, p. 73-104, 1998.

HULTÉN C. ; TULAMO R. M.; S UOMINEN M.M., e t a l.: A n on-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) a clinically useful inflammatory marker in the horse. **Vet Immunol Immunopathol**, v.68, p.267–81, 1999.

KITCHEN, W.H. The relationship between birthweight and gestational age in an Australian hospital population. **Australian Pediatric Journal**, v.4, p.29–37, 1968.

KOCHHAR, H. P.S.; SIMRAN, P.S.; RIPUDAMAN KAUR. Comparative Biochemical indices of fetal fluids in normal foaling and stressful delivery in Indian thoroughbred mares. **Journal of Equine Veterinary**, v. 17, n. 4, 1997.

MACPHERSON, M.L. Identification and management of the high-risk pregnant mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practice**, v.53, p.293-304, 2007.

McKINNON, A.O. Maintenance of pregnancy. **Proceedings of the Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners**, v.11, p. 81-117, 2009.

PIRRONE, A.; MARIELLA, J.; GENTILINI, F. *et al.* Amniotic fluid and blood lactate concentrations in mares and foals. **Theriogenology**, v. 78, p. 1182-1189, 2012.

ROSSDALE, P.D. The maladjusted foal: influences of intrauterine growth retardation and birth trauma. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.50, p.75-126, 2004.

ZANELLA, L.F.; TAKAHIRA, R.K.; MELO, C.M.; MAGALHÃES, L.C.O.; PRESTES, N.C. Biochemical profile of amniotic and allantoic fluid during different gestational phases in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, p.1-4, 2013.