

JULIANA IZZO OCTAVIANO

**Predição de parto de éguas gestantes de produtos muares e clones equinos**

São Paulo

2021

JULIANA IZZO OCTAVIANO

**Predição de parto de éguas gestantes de produtos muares e clones equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4126 FMVZ	Octaviano, Juliana Izzo Predição de parto de éguas gestantes de produtos mueres e clones equinos / Juliana Izzo Octaviano. – 2021. 55 f. : il.  Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.  Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientadora: Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes.  1. Periparto. 2. Secreção mamária. 3. pH. 4. Índice BRIX. 5. Eletrólitos. I. Título.
-----------------	--

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "PREDIÇÃO DA DATA DE PARTO DE ÉGUAS EM GESTAÇÕES DE PRODUTOS MUARES", protocolada sob o CEUA nº 3744190318 (ID 005501), sob a responsabilidade de **Cláudia Barbosa Fernandes e equipe; Juliana Izzo Octaviano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 19/09/2018.

We certify that the proposal "Prediction of foaling in mares carrying hybrid pregnancies", utilizing 34 Equines (34 females), protocol number CEUA 3744190318 (ID 005501), under the responsibility of **Cláudia Barbosa Fernandes and team; Juliana Izzo Octaviano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/19/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018 a 03/2020**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **5 a 15 anos**

N: **34**

Linhagem: **Mangalarga**

Peso: **350 a 550 kg**

Local do experimento: Fazenda Santa Rita II, Rodovia Aldo Bolini, km 82, 12970-000 Piracaia/SP

São Paulo, 19 de setembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Cláudia Barbosa Fernandes  
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "PREDIÇÃO DA DATA DE PARTO DE ÉGUAS EM GESTAÇÕES DE PRODUTOS MUARES".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004538)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 14/março/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A gestação na espécie equina apresenta período gestacional bastante variável e a grande maioria dos partos ocorrem no período noturno, momento este de maior tranquilidade ambiental. Assim, existe uma grande dificuldade no monitoramento dos partos, atividade está tão importante na espécie equina, o que torna a prática desafiadora e onerosa. Deste modo, uma maior exatidão na previsão da data do parto minimizaria o tempo, mão de obra e consequentemente os custos despendidos para a observação das éguas. Usualmente, alguns métodos são empregados na previsão do parto, como avaliação de mudanças físicas em éguas periparturientes e o tempo de gestação. Ambos os métodos se mostram pouco confiáveis, já que há uma grande variação racial e individual. Estudos em torno da alteração do pH e das concentrações de eletrólitos das secreções da glândula mamária, em éguas próximas do momento do parto, apresentam resultados consistentes, embora não haja relatos do uso destas técnicas em gestações de produtos híbridos e de clones equinos."

Comentário da CEUA: "O projeto foi atualizado com a adição de 38 éguas gestante de produtos muares ou clones equinos, e apresentado o termo de consentimento de uma nova empresa parceria. "

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Autor:** OCTAVIANO, Juliana Izzo

**Título:** Predição de parto de éguas gestantes de produtos muares e clones equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 08/11/2021

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos meus pais,  
Adilson e Regina, por ensinarem a mim  
e aos meus irmãos o sentido da família,  
união e perseverança.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Claudia Barbosa Fernandes, que além de orientadora, foi também uma mãe. Ela que é exemplo de líder, sempre nos guiando pelos melhores caminhos. Ela que sofre com a gente sempre que algo não sai como esperado. Tenho muito orgulho de ter podido estar com você durante essa caminhada. Obrigada pela confiança e por ter aberto as portas do LEPPE para que eu pudesse desenvolver este projeto.

Aos meus pais, Adilson e Regina, meu muito obrigada por todo o investimento e apoio durante todos esses anos. Vocês são ambos importantíssimos nesta caminhada, alicerces de tudo!!! Meu muitíssimo obrigada por estarem sempre ao meu lado, me incentivando em todos os aspectos da vida!!!!

Ao Antônio, por segurar as pontas enquanto eu não pude, por estar sempre pronto a me dar forças sempre que pensei em desistir. Obrigada por tudo e por tanto. Te amo.

Aos meus irmãos, Carolina e Luis Gustavo, pelo convívio durante todos esses anos. Mesmo longe, estaremos sempre unidos de alguma forma.

À Guta Alonso por ter aberto as portas da Fazenda Santa Rita e por todos os ensinamentos e ajudas até então. Quando penso em alguém competente, você sempre me vem a cabeça, simplesmente porque faz com maestria o que se propõe a fazer. Parabéns pela trajetória.

À InVitro Clonagem e seus colaboradores, principalmente a Perla Fleury, Ricardo Micai e Thiago Robilota, por terem confiado em nosso trabalho e terem nos cedidos os animais para o experimento, além da colaboração na construção de conhecimento.

À família LEPPE, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda! Sem vocês, esse projeto não seria possível. Em especial, quero agradecer muito a minha irmã de coração, Cleide Lazarotto. Nunca imaginei que no dia da nossa prova para o mestrado, a profi me apresentaria uma pessoa como você. Você é luz por onde passa, a melhor companheira de mestrado que alguém poderia querer e ter, e com certeza será uma companheira para o resto da vida. Obrigada pelos altos papos. Também agradeço a companheira de plantões



noturnos, Mariana Redoan. Obrigada por toda a ajuda e companhia!!! A Fernanda Jordão, obrigada por ser a luz no fim do túnel na estatística.

Agradeço imensamente a ajuda do Professor PhD Igor Canisso, Georgia Giorgia Podico e Daniel Angrimani, os quais foram fundamentais para a realização das estatísticas.

Agradeço todos os professores da FMVZ por todo o ensinamento durante as disciplinas e pelo caminho trilhado através da ciência. Em especial, agradeço a Profa. Camila Vannucchi, Prof. Marcílio Nichi e Profa. Viviani Gomes, pelos quais tenho imenso orgulho de ter podido aprender e sou muito grata.

Agradeço a todos os colegas da FMVZ que fiz ao longo das disciplinas e vivências durante o período do mestrado, com ênfase nos colegas do VRA e VCM que foram fundamentais na elaboração do projeto.

À Clara Mori e ao Laboratório da Clínica Médica da FMVZ-USP, por toda a ajuda na determinação da melhor forma de analisar as amostras do projeto e pelo belíssimo trabalho exercido. Muito obrigada.

A todos os estagiários que nos ajudaram em tantos momentos durante o desenvolvimento deste projeto, desde as coletas das amostras até as análises delas. Vocês foram essenciais!

Pelo auxílio financeiro concedido através do processo nº 2017/05425-0, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal.

## RESUMO

OCTAVIANO, J. I. **Predição de parto de éguas gestantes de produtos muares e clones equinos**. 2021. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O tempo de gestação dos equinos é bastante variável, tendo um intervalo aproximado entre 320 e 360 dias e aproximadamente 370 dias nas gestações de asininos. Para os híbridos muares, há divergências na literatura, com alguns relatos de períodos superiores, semelhantes e inferiores ao de gestações de produtos equinos. Nas gestações de produtos clones não encontramos relatos publicados de tempo gestacional. Uma particularidade dos equídeos é que a maioria dos partos ocorrem no período noturno, momento este de maior tranquilidade ambiental e de menor atividade em uma propriedade. Desta forma, existe uma grande dificuldade no monitoramento dos partos, atividade esta tão importante para os equídeos, tornando a prática desafiadora e onerosa. Deste modo, uma maior exatidão na previsão da data do parto minimizaria o período de monitoramento, a mão de obra e consequentemente os custos despendidos neste processo. Usualmente, alguns métodos são empregados na previsão do parto, como avaliação de mudanças físicas em éguas periparturientes e o tempo de gestação. Ambos os métodos se mostram pouco confiáveis, já que há uma grande variação racial e individual. Estudos com alteração do pH, índice BRIX e das concentrações de eletrólitos das secreções da glândula mamária, em éguas próximas do momento do parto apresentam resultados consistentes, embora não haja relatos do uso destas técnicas em gestações de produtos híbridos e de clones equinos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros que auxiliem na busca da predição da parição de éguas gestantes de produtos muares e produtos clones equinos, estabelecendo um controle comparativo com as gestações de produtos espécie-específicos equinos não clones, com base nos parâmetros físicos de relaxamento vulvar e relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos e pH, índice BRIX e concentração de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio nas secreções mamárias dos seis dias que antecedem o parto até a data do parto. Foram utilizadas 60 éguas divididas em 3 grupos distintos: 25 éguas gestantes de produtos muares (GM), 20 éguas gestantes de produtos equinos clones (GCL) e 15 éguas gestantes de produtos equinos (GE). Todos os animais foram avaliados diariamente desde os 325 dias de gestação até o dia do parto, que foi supervisionado. Foram avaliados os relaxamentos dos ligamentos sacroisquiáticos e vulvares, aos quais foram atribuídos escores que variavam de 0 (sem relaxamento) a 3 (relaxamento intenso),

e as secreções mamárias quanto ao pH em fitas colorimétricas e em pHmetro, índice BRIX e concentração de eletrólitos. Para a análise laboratorial e estatística, foram selecionados apenas os dados e amostras a partir do 6º dia pré-parto (D-6) até o dia do parto (D0), totalizando 7 dias avaliados por égua (D-6, D-5, D-4, D-3, D-2, D-1 e D0). Os parâmetros físicos de relaxamento avaliados tiveram um aumento gradativo no escore com a aproximação do dia do parto, com escores de 2,81, 2,79 e 2,68 para o GE, GM e GCL no dia do parto, respectivamente. Apenas no grupo de GM obteve-se um relaxamento maior no dia do parto quando comparado aos outros dias avaliados. A utilização das fitas colorimétricas para a mensuração do pH *in vivo* se mostrou válida por ter demonstrado diminuições expressivas do pH no dia do parto (D0). Foram detectadas diferenças entre grupos para o pH em fitas colorimétricas antes da congelação das amostras, com o pH menor nas gestações dos grupos GCL e GM. Na mensuração realizada com o pHmetro após a descongelação das amostras, apenas o grupo GCL obteve médias maiores de pH. Notavelmente, a congelação das amostras das secreções mamárias afetou diretamente seu pH. A avaliação do índice BRIX não mostrou diferenças entre os grupos estudados, mas sim entre os tempos. Todos os eletrólitos estudados tiveram relação positiva na predição do parto devido às alterações em suas concentrações na proximidade do parto, mas sem diferenças entre os grupos analisados. Assim, conclui-se que os parâmetros físicos avaliados foram insuficientes para a busca da predição do parto na espécie equina devido a sua grande variação, e que o pH em fitas colorimétricas compreende em um método eficaz e prático para esta finalidade. Além disso, o índice BRIX não demonstrou bom preditor do parto em nenhum grupo avaliado devido a grande variabilidade entre as éguas. As mensurações das concentrações de eletrólitos demonstraram ser bons preditores do parto, embora oneroso e pouco acessível pela metodologia utilizada. Desta forma, testes rápidos para mensuração de eletrólitos poderiam ser incluídos na rotina para que essas mensurações pudessem ser utilizadas com maior praticidade, incluindo a mensuração de fósforo, eletrólito relatado pela primeira vez neste trabalho como preditor do parto na espécie equina.

Palavras-chave: Periparto. Secreção mamária. pH. Índice BRIX. Eletrólitos.

## ABSTRACT

OCTAVIANO, J. I. **Prediction of foaling in mares carrying mule and equine clone pregnancies.** 2021. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Gestational length in horses is very variable, having an approximate interval of 320 and 360 days and approximately 370 days in donkey pregnancies. For mule hybrids, there are divergences in the literature, with some reports superior, similar and inferior periods than equine product pregnancies. In pregnancies with clone foals, we did not find published reports of gestational length. A peculiarity of equine is that most births occur at night, a time of greater environmental tranquility and less activity on a property. Thus, there is great difficulty in monitoring births, an activity that is so important in the equids, making the practice challenging and costly. Thus, greater accuracy in predicting the foaling date would minimize the monitoring period, the labor and, consequently, the costs incurred in this process. Usually, some methods are used to predict parturition, such as the assessment of physical changes in periparturient mares and the length of gestation. Both methods prove to be unreliable, as there is great breed and individual variation. Studies with changes in pH, BRIX index and electrolyte concentrations of mammary gland secretions in mares close to the time of parturition have shown consistent results, although there are no reports on the use of these techniques in pregnancies of hybrid foals and equine clones. Thus, the objective of this study was to evaluate parameters that help predicting foaling of pregnant mares of mule and equine clone foals, establishing a comparative control with the pregnancies of no clone species-specific equine foals, based on physical relaxation parameters vulvar and sacroischiatic ligament relaxation, and pH, BRIX index and concentration of calcium, phosphorus, magnesium, sodium and potassium in mammary gland secretions from the six days prior to parturition until foaling. Sixty mares were used, divided into 3 groups: 25 mares in the pregnant mule foal group (GM), 20 mares in the pregnant clones equine foal group (GCL) and 15 mares in the pregnant equine foal group (GE). All animals were evaluated daily from 325 days of gestation until the day of foaling, which was monitored. Relaxation of the sacroischiatic and vulvar ligaments, which were assigned scores ranging from 0 (no relaxation) to 3 (intense relaxation), and mammary gland secretions according to pH in colorimetric strips and pH meter, BRIX index and electrolyte concentration were evaluated. For laboratory and statistical analysis, data and samples were selected from the 6th pre-partum day (D-6) until the day of foaling

(D0), totaling 7 days evaluated per mare (D-6, D-5, D-4, D-3, D-2, D-1 and D0). The physical relaxation parameters evaluated had a gradual increase in the score as the day of foaling approached, with scores of 2.81, 2.79 and 2.68 for the GE, GM and GCL on the day of delivery, respectively. Only in the GM group was there a greater relaxation on the day of delivery when compared to the other days evaluated. The use of colorimetric tapes to measure the pH *in vivo* proved to be valid having shown significant decreases in pH on the day of delivery (D0). Differences between groups were detected for pH on colorimetric strips before freezing the samples, with the lowest pH in pregnancies in the GCL and GM groups. In the measurement performed with the bench pH meter after thawing the samples, only the GCL group had higher pH means. Notably, freezing the mammary gland secretion samples directly affected their pH. BRIX assessment did not show differences between the groups studied, but between times. All electrolytes studied had a positive relationship in predicting delivery due to changes in their concentrations near delivery, but without differences between the analyzed groups. Thus, it is concluded that the physical parameters evaluated were insufficient to predict parturition in equine species due to its wide variation, and that the pH in strip test is an effective and practical method for this purpose. Furthermore, the BRIX index did not show a good predictor of parturition in any group evaluated due to the great variability between mares. Measurements of electrolyte concentrations have been shown to be good predictors of foaling, although costly and inaccessible by the methodology used. Thus, rapid tests for measuring electrolytes could be routinely included so that these measurements could be used with greater practicality, including the measurement of phosphorus, an electrolyte that was reported for the first time in this work as a predictor of parturition in the equine species.

Keywords: Peripartum. Mammary secretion. pH. BRIX index. Electrolytes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Classificação do relaxamento vulvar de uma égua no pré-parto, por meio da utilização de um sistema de escores, com variação de 0 a 3 e escala de 1..... 32
- Figura 2 Classificação do relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos de uma égua no pré-parto, por meio da utilização de um sistema de escores, com variação de 0 a 3 e escala de 1..... 32
- Figura 3 Após o resfriamento dos tubos de politetrafluoretileno (Teflon®), foram abertos na capela de exaustão e seus conteúdos transferidos para tubos de centrífuga, onde água deionizada foi adicionada ultrapura até completar 14 ml..... 35

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos equinos (resultados expressos em partes por milhão).....	40
Gráfico 2	Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos muares (resultados expressos em partes por milhão).....	41
Gráfico 3	Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos equinos clones (resultados expressos em partes por milhão).....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de escore utilizado para a determinação do dia do parto de acordo com a média das concentrações dos eletrólitos (cálcio, sódio e potássio) nas secreções mamárias de éguas.....	24
Tabela 2	Médias $\pm$ erros padrão dos escores de relaxamento vulvar de éguas pré-parto ao longo dos tempos, entre os grupos.....	36
Tabela 3	Médias $\pm$ erros padrão dos escores de relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos de éguas pré-parto ao longo dos tempos, entre os grupos.....	37
Tabela 4	Médias $\pm$ erros padrão das mensurações de pH em fitas colorimétricas pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto, entre os tempos.....	37
Tabela 5	Médias $\pm$ erros padrão das mensurações de pH em fitas colorimétricas pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto, entre os grupos.....	38
Tabela 6	Comparação entre as médias $\pm$ erros padrão do pH em fitas colorimétricas pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias.....	38
Tabela 7	Médias $\pm$ erros padrão dos valores de pH em pHmetro obtidas a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas pré-parto entre os tempos.....	38
Tabela 8	Médias $\pm$ erros padrão dos valores de pH em pHmetro obtidas a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas entre os grupos.....	39
Tabela 9	Médias $\pm$ erros padrão das mensurações do índice BRIX pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto entre os tempos (resultados expressos em porcentagem).....	39
Tabela 10	Médias $\pm$ erros padrão das mensurações do índice BRIX pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto entre os grupos (resultados expressos em porcentagem).....	40
Tabela 11	Médias $\pm$ erros padrão dos valores de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio obtidos a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas pré-parto em relação aos tempos (resultados expressos em partes por milhão).....	42



Tabela 12	Médias $\pm$ erros padrão dos valores de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio obtidos a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas pré-parto entre os grupos (resultados expressos em partes por milhão).....	43
-----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ca	Cálcio
D0	Dia do parto
D-1	1 dia antes do parto
D-2	2 dias antes do parto
D-3	3 dias antes do parto
D-4	4 dias antes do parto
D-5	5 dias antes do parto
D-6	6 dias antes do parto
GCL	Gestação equina de produtos clones equinos
GE	Gestação equina espécie-específica controle
GM	Gestação equina de produtos muares
K	Potássio
Kg	Quilo
L	Litro
Mg	Magnésio
ml	Mililitros
mmol	Milimol
Na	Sódio
P	Fósforo
ppm	Partes por milhão
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1 PREDIÇÃO DO PARTO NA ESPÉCIE EQUINA .....	21
2.2 OBJETIVO GERAL .....	26
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 PREDIÇÃO DE PARTO DE ÉGUAS GESTANTES DE PRODUTOS MUARES E CLONES EQUINOS</b> .....	28
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.2.1 Local e animais .....	30
3.2.2 Avaliação dos parâmetros físicos.....	31
3.2.3 Avaliações das secreções mamárias.....	32
3.2.3.1 Avaliações imediatamente após colheita.....	32
3.2.3.2 Avaliações após descongelação.....	33
3.2.4 Análise estatística.....	35
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	36
3.3.1 Avaliação dos parâmetros físicos das éguas no pré-parto .....	36
3.3.2 Avaliação de pH das amostras de secreções mamárias pré-congelação e pós-descongelação em fitas colorimétricas .....	37
3.3.3 Avaliação de pH das amostras de secreções mamárias pós-descongelação em pHmetro..	38
3.3.4 Concentração de sólidos totais por meio de refratômetro de BRIX pré-congelação e pós-descongelação das amostras de secreção mamária.....	39
3.3.5 Concentração de eletrólitos das secreções mamárias das éguas no pré-parto .....	40
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>3.5 CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Embora seja um processo contínuo, o parto acontece rapidamente na espécie equina e pode ser dividido em 3 fases. A primeira fase ou fase de preparação do parto possui duração entre 30 minutos e 4 horas, a qual é marcada pela inquietação da égua e pela exibição de sinais similares aos de cólica. Assim que o corioalantoide se rompe, ocorre a liberação do líquido alantoideano e a segunda fase do parto se inicia. Esta fase tem duração média de 20 a 30 minutos e termina com a expulsão completa do potro. Na terceira fase do parto ocorre então a liberação das membranas fetais, que deve acontecer entre 30 minutos e 3 horas (WESSEL, 2005; BRINSKO et al., 2011; CHRISTENSEN, 2011).

Assim, quando comparada a outras espécies, a égua possui uma rápida evolução da sua preparação para o parto até o seu efetivo acontecimento, o que pode significar a sobrevivência ou não do potro em casos de distocia, destacando-se então a importância de sua precoce detecção e rápida intervenção (MCCUE; FERRIS, 2012). Além disso, algumas outras particularidades da espécie como a variação do período de gestação e a concentração de nascimentos no período noturno torna o acompanhamento do parto difícil de ser incluído na rotina, mesmo levando-se em conta os benefícios resultantes da prática (DAVIES MOREL; NEWCOMBE; HOLLAND, 2002; ELLERBROCK; CANISSO, 2016).

Desta forma, qualquer fator ou técnica que possa indicar a proximidade ou auxiliar na determinação da data do parto é considerada interessante para a indústria equina, tanto para diminuir os custos associados à mão de obra, quanto para aumentar a prática de monitoramento do parto (DAVIES MOREL; NEWCOMBE; HOLLAND, 2002).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PREDIÇÃO DO PARTO NA ESPÉCIE EQUINA

O parto de maneira geral não é um evento abrupto, mas sim um acontecimento que se desenvolve gradativamente, marcado por alterações morfológicas e funcionais do animal gestante e do próprio feto. Desta forma, a parturição pode ser dividida em 3 fases: a fase de preparação do parto, fase de expulsão do produto e fase de liberação das membranas fetais. A primeira fase do parto na espécie equina possui duração média de 2 horas e é caracterizada pelas contrações uterinas que clinicamente se assemelham aos observados nos casos de cólica, prolongando-se até o rompimento das membranas fetais, quando se dá início a segunda fase do parto. Esta por sua vez possui duração curta de aproximadamente 30 minutos e é finalizada com a expulsão completa do potro. Na terceira e última fase do parto ocorre então a liberação das membranas fetais, que deve acontecer entre 15 minutos e 2 horas (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Assim, quando comparada a outras espécies, o parto propriamente dito na espécie equina se dá de maneira rápida após contrações vigorosas da musculatura uterina, abdominal e diafragmática e, desta forma, distocias podem significar na perda do produto. Portanto, o diagnóstico precoce de eventuais problemas neste momento deve ser realizado o mais rápido possível para que sejam realizadas as manobras necessárias para a preservação da viabilidade fetal (PRESTES, 2000; MCCUE; FERRIS, 2012). Mas, algumas particularidades da espécie culminam em dificuldades para que este diagnóstico seja realizado, dentre elas a grande variação da duração da gestação e a concentração de nascimentos no período noturno, o que torna o acompanhamento do parto difícil de ser incluído na rotina, mesmo levando-se em conta os benefícios resultantes da prática (DAVIES MOREL; NEWCOMBE; HOLLAND, 2002; ELLERBROCK; CANISSO, 2016).

Assim, com base nesta problemática, se faz necessário que haja formas de prever o parto dos equídeos, para que o acompanhamento dos partos seja efetivado. Alguns parâmetros físicos são utilizados na determinação do momento do parto, incluindo o relaxamento vulvar e relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos, características atribuídas às concentrações de relaxina, que aumentam expressivamente a partir dos 176 a 200 dias de gestação, e se mantem altas até o dia do parto (STEWART;

STABENFELDT, 1981; WESSEL, 2005; MCCUE; MCKINNON, 2011). Este hormônio é produzido em maior quantidade pela placenta, e leva à mudanças no final da gestação devido às alterações bioquímicas nos índices de glicosaminoglicanos/colágeno nos tecidos, resultando no relaxamento das estruturas relacionadas às vias fetais na iminência do parto (KLEIN, 2016; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Infelizmente, existe uma grande variação entre éguas em relação à intensidade do relaxamento vulvar e relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos, já que algumas éguas exibem estes sinais semanas antes do parto e outras não, não sendo recomendada como parâmetro isolado de predição do parto (BROWN DOUGLAS et al., 2002). Um dos fatores que pode estar associado a esta grande variação é a raça do animal. Os cavalos trotadores, por exemplo, possuem concentrações mais altas de relaxina durante a maior parte da gestação quando comparados aos Puro Sangue Inglês. Também, esperam-se níveis menores de relaxina no final da gestação das jumentas quando comparado às éguas, o que pode interferir nos parâmetros físicos encontrados nesses animais (STEWART et al., 1992). Além disso, fatores como a paridade e a idade das éguas podem também culminar em padrões diferentes de relaxamento, como por exemplo nas éguas múltíparas que podem exibir sinais de relaxamento mais de uma semana antes do parto, ou ainda nas éguas nulíparas que podem não exibir sinais de relaxamento ou ainda demonstrar apenas sinais sutis (ELLERBROCK; CANISSO, 2016). Nós não encontramos na literatura relatos das concentrações deste hormônio em gestações de indivíduos híbridos obtidos a partir do cruzamento de equinos e asininos.

Levando-se em conta que as gestações de produtos clones equinos comumente apresentam alterações placentárias importantes (POZOR et al., 2016), que a placenta é a principal produtora de relaxina na espécie equina e que baixas concentrações de relaxina podem indicar insuficiência placentária (RYAN; VAALA; BAGNELL, 1998; RYAN et al., 1999), possivelmente pode haver diferenças entre os parâmetros físicos preditores do parto na espécie equina nestas gestações, já que a produção de relaxina poderia estar diminuída decorrente das anormalidades placentárias comumente encontradas.

O aumento do úbere decorrente da produção de secreções mamárias e de colostro também podem auxiliar na predição do parto e é considerado indicativo de maturidade fetal, relacionando-se assim à proximidade do parto. Este desenvolvimento do úbere é visto em resposta ao aumento dos progestágenos e diminuição das concentrações de estrógenos entre 4 a 6 semanas antes do parto, sendo que o colostro preenche o teto aproximadamente 2 a 14 dias antes do parto. Uma pequena “cera” pode se formar na

ponta dos tetos decorrente do extravasamento do colostro e do seu ressecamento na região, sendo geralmente observado entre 6 a 48 horas antes do parto (WESSEL, 2005).

Em algumas éguas, é possível identificar um gotejamento ou ejeção de uma quantidade constante de secreção mamária na proximidade do parto, o que pode não ser adequado quando se tratar de colostro devido à possível diminuição da sua quantidade e qualidade, gerando possíveis consequências a saúde do potro (CHRISTENSEN, 2011).

Como uma forma de incrementar as metodologias para a predição do parto na espécie equina, a avaliação das secreções mamárias parece estar ganhando cada vez mais destaque. Isso porque alterações em sua aparência e composição eletrolítica podem ser vistas com a aproximação do momento do parto. Mensurações dos eletrólitos nas secreções mamárias (OUSEY; DUDAN e ROSSDALE, 1984; LEY et al., 1989, 1993; BROWN DOUGLAS et al., 2002; WESSEL, 2005), mensuração do seu pH (CANISSO et al., 2013; KOROSUE, 2013; KOROSUE et al., 2013; ELLERBROCK; CANISSO, 2016) e do índice BRIX avaliada em refratômetro (CASH, 1999; KOROSUE et al., 2013) são as possíveis técnicas já relatadas na literatura, com resultados promissores e confiáveis.

Quanto às características macroscópicas das secreções mamárias, a cor e viscosidade são os parâmetros já utilizados rotineiramente, uma vez que existe uma tendência à transformação da coloração das secreções mamárias de um fluido cor de palha para um branco leitoso e também para um aumento da viscosidade na proximidade do parto (BRINSKO et al., 2011). Ainda, com a transformação das secreções mamárias em colostro, há também a transformação para uma coloração amarelada ou mesmo alaranjada, característica está associada à concentração de imunoglobulinas, mas que se mostra ser um parâmetro muito subjetivo para ser utilizada como um único indicador de qualidade do colostro (CHAVATTE et al., 1998). Um estudo de Peaker et al. (1979) classificou as secreções mamárias em 5 grupos: dourado, dourado turvo, palha claro, palha turvo e branco leitoso, dos quais observaram que 77% das éguas apresentavam coloração branco leitoso no dia do parto.

Em relação aos eletrólitos das secreções mamárias, são relatadas alterações em suas concentrações ao final da gestação, as quais podem ser utilizadas para auxiliar na determinação do momento do parto (PEAKER et al., 1979; OUSEY; DUDAN e ROSSDALE, 1984; KOROSUE, 2013). Unanimemente, são relatadas aumento nas concentrações de cálcio nas secreções mamárias (LEADON; JEFFCOTT e ROSSDALE, 1984; OUSEY; DUDAN e ROSSDALE, 1984; LEY et al., 1989; BROWN DOUGLAS



et al., 2002; CANISSO et al., 2013; KOROSUE et al., 2013). Em 1984, Leadon; Jeffcott e Rossdale demonstraram que as concentrações de cálcio na secreção mamária possuem valor preditivo para o parto, correlacionando ainda níveis abaixo de 3 mmol/l de cálcio no momento do parto a um prognóstico ruim de sobrevivência neonatal. Kits colorimétricos comerciais para análise de cálcio foram utilizados por Ley et al. (1993) para mensurar a concentração de cálcio, com resultados que mostraram boa sensibilidade e especificidade, o que é satisfatório devido a sua praticidade. Infelizmente, esse tipo de teste rápido não está disponível no Brasil.

Além do cálcio, outros eletrólitos como o sódio e o potássio na secreção mamária podem ter grande valia na predição do parto, visto que as concentrações de sódio diminuem com a proximidade do parto, enquanto as de potássio aumentam significativamente no dia do parto (OUSEY; DUDAN e ROSSDALE, 1984; BROWN DOUGLAS et al., 2002; CANISSO et al., 2013).

Devido às alterações de concentrações dos eletrólitos nas secreções mamárias, um sistema de escore foi proposto com base nas concentrações de cálcio, sódio e potássio com o intuito da busca de uma predição mais acurada. Segundo este sistema, conforme determinadas concentrações pré-definidas pelos autores são alcançadas, são atribuídos escores a cada um dos eletrólitos, os quais pontuam de 5 a 15 pontos, podendo desta forma obter uma pontuação máxima de 45 pontos. Quando a soma dos escores atribuídos aos três eletrólitos atingem uma pontuação de 35 pontos, sugere-se que o parto irá acontecer nas próximas 24 horas (Tabela 1) (OUSEY; DUDAN e ROSSDALE, 1984).

Tabela 1 - Sistema de escore utilizado para a determinação do dia do parto de acordo com a média das concentrações dos eletrólitos (cálcio, sódio e potássio) nas secreções mamárias de éguas.

CÁLCIO (mmol/L)	SÓDIO (mmol/L)	POTÁSSIO (mmol/L)	PONTOS POR ELETRÓLITO
≥ 10	≤ 30	≥ 35	15
≥ 7	≤ 50	≥ 30	10
≥ 5	≤ 80	≥ 20	5

Fonte: Ousey; Dudan e Rossdale (1984).

O modelo acima foi avaliado por Brown Douglas et al. (2002) em éguas Puro Sangue Inglês, os quais demonstraram sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos menores que os evidenciados por Ousey; Dudan e Rossdale (1984), além de uma grande variação entre as éguas. Desta forma, estes autores concluíram não ser confiável e precisa a utilização apenas das concentrações de eletrólitos para

determinação do momento do parto, e sugeriram que um sistema de pontuação focado não só nas concentrações de eletrólitos, mas também nos fatores físicos e comportamentais poderia ser interessante para a melhoria da previsão do parto. Ainda, é sabido que anormalidades placentárias, como a placentite, podem alterar as concentrações de eletrólitos nas secreções mamárias e, por este motivo, este parâmetro não deve ser utilizado como preditor do parto nestas éguas (ROSSDALE et al., 1991).

Deste modo, na busca de uma predição mais acurada e para incremento das avaliações das secreções mamárias, Korosue et al. (2013) adotaram a medição do pH das secreções mamárias por meio de fitas colorimétricas e reportaram uma diminuição do pH das secreções mamárias com a proximidade do parto, sugerindo que um valor de pH médio em 6,4 indica proximidade do parto.

Com o intuito de determinar o pH das secreções mamárias das éguas e de correlacioná-las com as concentrações de eletrólitos, Canisso et al. (2013) demonstraram que o pH declinou significativamente 24 horas antes do parto ( $\text{pH} \leq 7$ ) em 80% das éguas do estudo. Além disso, obtiveram uma correlação alta e significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o pH e os seguintes eletrólitos: sódio, cloro, cálcio e potássio. Com o eletrólito magnésio, houve uma correlação moderada. Comparando as concentrações 4 dias antes do parto com o dia do parto, identificaram um aumento nas concentrações de cálcio, magnésio e potássio, e uma diminuição nas concentrações de sódio e cloro nas mesmas condições. Neste estudo houve ainda a comparação da mensuração do pH em teste de fita e pHmetro, demonstrando uma alta correlação entre as variáveis.

Desta forma, tanto Canisso et al. (2013) quanto Korosue (2013) concordam que a mensuração em fitas de pH colorimétricas tem como vantagem o uso de uma pequena quantidade de amostra, além da rapidez de execução, baixo custo e resultados imediatos.

Além das fitas colorimétricas para a mensuração do pH, o pHmetro também pode ser utilizado, com a desvantagem de ser mais caro e necessitar que a amostra chegue ao laboratório para a sua avaliação, caso o aparelho não seja portátil. Porém, seus resultados são mais precisos quando comparado aos resultados obtidos pela fita colorimétrica, que utilizam graduações diversas conforme fabricante entre 0,2 a 1 unidade, não permitindo assim que variações sutis de pH sejam identificadas (ELLERBROCK; CANISSO, 2016)

Um fator de atenção nas avaliações de pH e de eletrólitos das secreções mamárias é o horário no qual se realiza a coleta das secreções mamárias. Isso porque amostras coletadas no período da manhã podem não refletir as mudanças de eletrólitos que ocorrem ao entardecer do dia ou a noite, período em que a grande maioria dos partos ocorrem.

Assim, é indicado que a mensuração seja realizada mais próxima do anoitecer (WESSEL, 2005).

O mecanismo fisiológico pelo qual ocorre a redução do pH na proximidade do parto em equinos ainda não foi elucidado. Em estudo com vacas holandesas, Kitade et al. (2003) constataram que o epitélio da glândula mamária sintetiza e secreta maior quantidade de anidrase carbônica no colostro do que no leite. Assim, pode-se supor que o aumento das concentrações de anidrase carbônica concomitante a formação do colostro, pode levar a uma redução do pH das secreções mamárias, conseqüentemente, o que é intensificado com a proximidade do parto.

Além de todos esses parâmetros mencionados, o uso de refratômetro de BRUX, que originalmente é utilizado para a mensuração das concentrações de açúcares de soluções, avalia indiretamente a quantidade de imunoglobulinas no colostro, sendo proposto por esse motivo como possível aliado na predição do parto, já que os níveis de imunoglobulinas tendem a aumentar com a proximidade do parto. Infelizmente, um estudo concluiu que esta avaliação não se mostrou com um alto valor preditivo, já que houve variação considerável entre éguas no dia do parto (entre 16,4% e 32,7%), além de que 4 das 27 éguas avaliadas terem parido com valores abaixo de 20% (KOROSUE et al., 2013).

Desta forma, fica claro que ainda temos lacunas nesta semântica, e que não existe relatado na literatura nenhum parâmetro ou teste único e definitivo para a predição do momento do parto nas éguas, em gestações espécie específicas, e muito menos em gestações de produtos híbridos ou de produtos provenientes de biotécnicas reprodutivas como a clonagem.

## 2.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do projeto foi avaliar parâmetros físicos e laboratoriais que auxiliem na predição da parição de éguas gestantes de produtos muares e produtos clones equinos, estabelecendo um controle comparativo com as gestações de produtos espécie-específicos equinos.

## 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do projeto foram avaliar por meio de escores os parâmetros físicos de relaxamento vulvar e relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos, além de avaliar o pH, índice BRIX e concentração de eletrólitos (cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio) das secreções mamárias das éguas gestantes de produtos muars e de produtos clones equinos, dos seis dias que antecedem o parto até a data do parto, comparando aos dados encontrados nas gestações de produtos equinos controle.

### 3 PREDIÇÃO DE PARTO DE ÉGUAS GESTANTES DE PRODUTOS MUARES E CLONES EQUINOS

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A busca pelo parto assistido na espécie equina se mostra uma prática de extrema importância na prevenção de complicações associadas às distocias, garantindo desta forma o suporte necessário para a égua e potro. Isso porque o parto de éguas ocorre rapidamente após contrações vigorosas da musculatura uterina, abdominal e diafragmática, no qual eventos envolvidos neste momento podem afetar diretamente a viabilidade neonatal (PRESTES, 2000). Byron et al., (2002) comprovaram que a duração da fase expulsória do parto está intimamente ligada à sobrevivência do potro e um acréscimo de apenas 13,6 minutos nesta fase pode afetar a viabilidade neonatal. Assim, nos casos de distocia, o acompanhamento do parto e consequente resolução do problema podem significar em menor tempo para o nascimento, aumentando as chances de sobrevivência do potro e da égua. Infelizmente, a prática se mostra onerosa e de difícil execução na prática devido às concentrações dos partos no período noturno e pela grande variação do tempo gestacional na espécie equina (KURTZ FILHO et al., 1997; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

O gênero *Equus* abrange espécies de animais domésticos de grande importância na sociedade, com destaque para os equinos (*Equus caballus*, 2n=64) e para os asininos (*Equus asinus*, 2n=62). Ainda, o cruzamento destas duas espécies resulta nos muares e os bardotos (2n=63 cromossomos), híbridos equídeos mais comumente encontrados (ALLEN et al., 2011). Os muares são considerados animais fortes, resistentes, ágeis, ativos e com grande facilidade de aprendizado e vigor físico (FARIAS, 2014; RIBEIRO et al., 2017).

Existem divergências na literatura quanto ao tempo de gestação dos produtos muares. Isso porque alguns autores relatam que esse tempo varia entre o das gestação de produtos espécie-específicos equinos (320 e 360 dias) e o dos asininos (343 e 375 dias) (GIGER; MEIER; KÜPFER, 1997; LESTER, 2011; LANDIM-ALVARENGA, 2017), ou pode estar apenas relacionado ao tempo de gestação da égua gestante (RICCIO et al., 2016) ou ainda com tempo gestacional menor do que das éguas gestando produtos espécie-específicos (BOAKARI et al., 2019).

Devido às diversas utilizações dos muares em atividades esportivas e de trabalho, há uma crescente busca por exemplares geneticamente superiores e hígdidos. Assim, para garantir o nascimento de um mular saudável, o primeiro passo é o acompanhamento da gestação desses animais e por fim o monitoramento do parto, para garantir a higidez materna e fetal. Infelizmente, nenhum trabalho na literatura foi encontrado acerca dos pródromos do parto de éguas gestantes de produtos muares, mas possivelmente pode haver diferenças já que se sabe das diferenças no perfil hormonal destas gestações já no primeiro terço da gestação, como por exemplo as concentrações inferiores de eCG quando comparadas às gestações espécie-específicas (ALLEN, 1969; ANDERSON, 1988; BOETA; ZARCO, 2005). Ainda neste pensamento de diferenças endocrinológicas nas gestações de produtos muares e sabendo do papel fundamental da unidade feto-placentária no desencadeamento do parto, poderia haver diferenças reflexas nos parâmetros preditores de parto, tanto físicos quanto nas secreções mamárias.

Ainda na busca de eficiência reprodutiva, biotecnológicas vêm sendo cada vez mais empregadas na indústria equina, dentre elas, a clonagem animal. Como uso potencial da técnica pode-se preservar a genética de indivíduos que não podem se reproduzir, como animais castrados, e ainda preservar o material genético de animais ameaçados de extinção (VANDERWALL et al., 2006), além da possibilidade de recriar animais idosos, com sub ou infertilidade adquirida e com características genéticas comerciais relevantes ou de animais que vieram a óbito (MASERATI; MUTTO, 2016).

Embora a clonagem equina seja uma realidade, sua eficiência ainda não se mostra ideal, possivelmente devido ao não entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na reprogramação nuclear, bem como às alterações epigenéticas dos embriões e fetos, refletidos nas altas taxas relatadas de perda embrionária e abortos, anormalidades fetais e distocia, que tem diminuído com o avançar da técnica (GAMBINI et al., 2012; WAKCHAURE; GANGULY, 2016).

Além disso, alterações placentárias dos produtos clonados são comumente vistas em diversas espécies, inclusive na equina (HILL et al., 2001; VANDERWALL et al., 2006; CHAVATTE-PALMER et al., 2012; POZOR et al., 2016). Outra alteração comumente presente é a placentite bacteriana, considerada uma importante complicação nestas gestações (POZOR et al., 2016).

Uma vez que a unidade feto placentária está envolvida no mecanismo hormonal de desencadeamento do parto, a presença de alterações gestacionais e placentárias já relatadas na literatura poderiam refletir no desenvolvimento dos parâmetros físicos de

proximidade do parto nas gestações de equinos clones, além de alterações nos componentes das secreções mamárias que afetariam diretamente as concentrações de eletrólitos, pH e índice BRIX.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar e classificar por meio de escores os parâmetros físicos de relaxamento vulvar e relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos das éguas gestantes de produtos muares e produtos equinos clones, bem como determinar os valores médios de pH, índice BRIX e concentrações de eletrólitos (cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio) nas secreções mamárias dos seis dias que antecedem o parto até a data do parto, fazendo um comparativo com as gestações espécie específicas controle.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e seu desenvolvimento conforme as diretrizes da mesma, sob o protocolo número 3744190318.

### **3.2.1 Local e animais**

O experimento foi realizado na Fazenda Santa Rita II, localizada na cidade de Piracaia, no estado de São Paulo (Latitude: 23<sup>a</sup>03'14" sul; Longitude: 46<sup>o</sup>21'29" oeste; Altitude: 792 metros), local que abrigou as éguas gestantes de produtos equinos (GE) e de muares (GM), as quais foram utilizadas nas estações reprodutivas 2015/2016, 2016/2017 e 2018/2019. No total foram utilizadas 40 éguas gestantes da raça Mangalarga, sendo que 25 éguas gestavam produtos híbridos (muares) e 15 gestavam produtos equinos. Neste local, as éguas foram submetidas a um mesmo manejo e alimentação, sendo mantidas em pasto de Tifton, com livre acesso a água e sal mineral e, a partir de 1 mês antecedente à data prevista para o parto, foi fornecido um quilograma de concentrado comercial (15% de proteína, Equitage 15, Guabi®). Foram selecionadas apenas éguas saudáveis para o experimento, que não apresentaram distocia e alterações placentárias nos partos em que foram realizadas as colheitas das amostras e dados.

O segundo local em que foi realizado o experimento foi na cidade de Mogi Mirim no estado de São Paulo, propriedade da empresa In Vitro Brasil Clonagem Animal SA (Latitude: 22°22'46.49" sul; Longitude: 47° 0'27.86" oeste; Altitude: 660m). Neste local, foram utilizadas 20 éguas matrizes gestantes de produtos equinos clones (GCL) nas estações reprodutivas 2018/2019. As matrizes gestantes de produtos clones equinos foram transportadas para a propriedade da empresa aos 90 dias de gestação, onde foram mantidas até 4 meses após o parto. Todas foram mantidas em um mesmo manejo, recebendo feno de Tifton, água a vontade e concentrado desde os 90 dias de gestação (12% de proteína, Proequi, Guabi®), a qual foi ofertada 4 kg por dia, dividida em 2 pratos a partir dos 280 dias. A identificação dos animais clonados foi mantida em sigilo.

As éguas em ambas as propriedades foram acompanhadas diariamente a partir de 325 dias de gestação até o parto. Todas as avaliações e coletas de amostras das éguas foram realizadas após as 17h30. Além disso, foram realizados plantões noturnos, a partir de 325 dias de gestação e todos os partos foram supervisionados.

Dentro deste período, os parâmetros físicos relacionados a proximidade do parto foram avaliados, fotografados e seus resultados anotados em planilhas individuais. Foram também realizadas avaliações imediatas das secreções mamárias: pH em fitas colorimétricas e índice BRIX em refratômetro, bem como a coleta e congelamento de amostras em criotubos em freezer -20°C para as avaliações laboratoriais.

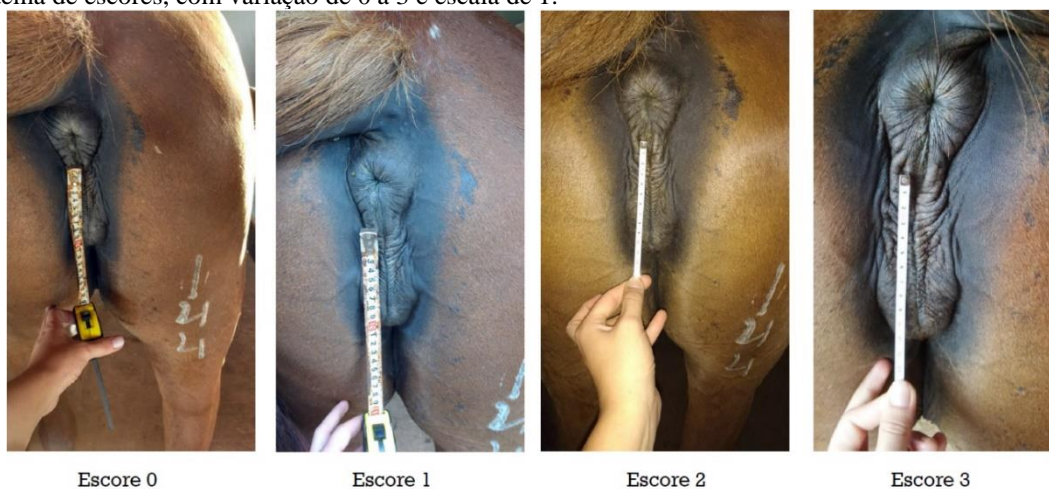
Para a análise dos parâmetros físicos e laboratoriais, foram utilizados dados e amostras a partir do 6º dia pré-parto (D-6) até o dia do parto (D0), totalizando 7 amostras por égua (D-6, D-5, D-4, D-3, D-2, D-1 e D0).

### 3.2.2 Avaliação dos parâmetros físicos

O relaxamento vulvar e o relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos de todas as éguas participantes do experimento foram avaliados por um examinador que, diariamente, classificou os relaxamentos por meio de um sistema de escores. Para isso, uma escala foi utilizada, em que o escore poderia ser classificado de 0 a 3, sendo 0 o não relaxamento e o 3 o relaxamento intenso, com escala de 1, conforme a Figura 1 e 2.



Figura 1 - Classificação do relaxamento vulvar de uma égua no pré-parto, por meio da utilização de um sistema de escores, com variação de 0 a 3 e escala de 1.



Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

O escore 0 demonstra o não relaxamento, enquanto o escore 3 demonstra um relaxamento intenso. Na imagem é mostrada a evolução do relaxamento vulvar de um único animal.

Figura 2 - Classificação do relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos de uma égua no pré-parto, por meio da utilização de um sistema de escores, com variação de 0 a 3 e escala de 1.



Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

O escore 0 demonstra o não relaxamento, enquanto o escore 3 demonstra um relaxamento intenso. Na imagem é mostrada a evolução do relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos de um único animal.

Após as avaliações visuais dos parâmetros físicos efetuadas pelo examinador, fotografias foram realizadas para posterior avaliação por três examinadores às cegas (triplo-cego), o que resultou em 4 escores/dia para cada égua. Fez-se então uma média desses valores obtidos para cada dia de avaliação das éguas.

### 3.2.3 Avaliações das secreções mamárias

#### 3.2.3.1 Avaliações imediatamente após colheita

No primeiro dia de coleta, todas as éguas tiveram seu úbere lavado com água e sabão seguido da secagem com papel toalha descartável e, até o parto, o úbere foi limpo apenas com papel toalha diariamente.

Para a colheita diária das amostras, foi desprezada a primeira fração de secreção mamária retida no teto das éguas. Após este processo, uma gota da secreção foi colocada sobre uma fita colorimétrica comercial com graduação 5,5 a 8,0, em escala de 0,2 (Hydrion®, *Micro Essential Laboratory*, USA) para a avaliação do pH.

Na sequência, a avaliação em refratômetro de BRIX com escala de 0 a 50% foi realizada a partir da colocação de 2 ou 3 gotas de secreção mamária na superfície do prisma azul do aparelho. Após o fechamento da tampa acrílica sobre a amostra, foi então mensurado o índice BRIX da secreção por meio do visor óptico.

Após estas avaliações, uma alíquota de aproximadamente 1,5 a 2 ml de secreção mamária foi coletada e armazenada em criotubo. É importante ressaltar que algumas éguas não produziram quantidade suficiente para o armazenamento. Sendo assim, a colheita e armazenamento das amostras foi realizada quando se tinha uma quantidade mínima de 0,5 ml de secreção mamária. Os criotubos foram sempre identificados com o nome da égua e data da colheita e então colocados em caixas de armazenamento, que foram alocadas em freezer -20°C até o momento das avaliações laboratoriais.

#### *3.2.3.2 Avaliações após descongelação*

As amostras passaram por avaliação no Laboratório da Clínica Médica, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, na Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Primeiramente, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após este processo, a amostra foi homogeneizada com o auxílio de um agitador vórtex e então submetida as avaliações.

A mensuração do pH em fita obedeceu ao mesmo critério realizado imediatamente após a colheita. Já para a mensuração em pHmetro, foi utilizado o modelo PHS3BW, *Bel Engineering*®, com o microeletrodo de 3mm para pequenos volumes (*Hanna*®), o qual foi introduzido dentro do criotubo com a secreção para a mensuração do pH. Anteriormente às análises, o pHmetro foi calibrado em soluções tampões de pH 11 e pH 4, conforme instruções do fabricante. A cada mensuração, o eletrodo era limpo com água deionizada ultrapura e seco com lenços de papel macio.

Após isso, 2 ou 3 gotas de secreção mamária foram novamente utilizadas em refratômetro de BRIX com escala de 0 a 50%, conforme já descrito.

Para que a mensuração dos eletrólitos ocorresse, as amostras das secreções mamárias foram primeiramente submetidas a um processo de digestão. Para isso, com o auxílio de uma pipeta monocal Eppendorf® acoplada a uma ponteira descartável, foi pesado cerca de 0,5g de amostra em frascos de politetrafluoretileno (Teflon®) em balança analítica de precisão (AY220, Shimadzu®). Em seguida, os tubos foram levados à capela de exaustão, nos quais foram acrescidos 1,5 ml de ácido nítrico a 65% (EMSURE®, Merck), 1,5 ml de peróxido de hidrogênio a 30% (EMSURE®, Merck) e 4,5 ml de água deionizada ultrapura. Os tubos foram então lacrados com suas tampas específicas e levados ao forno micro-ondas (MarsXpress, CEM®) e submetidos a uma curva de aquecimento pré-programada. O programa utilizado foi: rampa de aquecimento em tempo de 10 minutos e tempo de permanência de 5 minutos para a temperatura de 80°C, tempo de rampa de 8 minutos e tempo de permanência de 10 minutos para a temperatura de 120°C, e tempo de rampa 18 minutos e tempo de permanência de 15 minutos para a temperatura de 190°C. Após a curva de aquecimento, os tubos permaneceram em resfriamento dentro do micro-ondas por 30 minutos.

Após o resfriamento e a retirada dos tubos do micro-ondas, estes foram levados novamente a capela de exaustão, onde foram abertos e seus conteúdos foram transferidos para tubos para centrífuga de 15 ml (Falcon®). Ao volume resultante, foi adicionada água deionizada ultrapura até um volume final de 14 ml (Figura 3).

As amostras foram então analisadas em espectrômetro de emissão óptica (Varian, modelo 710-ES), no qual foram mensuradas as concentrações de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na) e potássio (K). Todos os valores obtidos após a análise são expressos na unidade partes por milhão (ppm).

Figura 3 - Após o resfriamento dos tubos de politetrafluoretileno (Teflon®), foram abertos na capela de exaustão e seus conteúdos transferidos para tubos de centrifuga, onde água deionizada foi adicionada ultrapura até completar 14 ml.



Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

### 3.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo programa SAS versão 9.3. As premissas normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram previamente testadas e quando necessárias foram realizadas as devidas transformações e retirada de *outliers*. As variáveis: relaxamento de vulva, relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos, pH em fitas colorimétricas e índice BRIX antes da congelação e após o descongelamento, pH em pHmetro, concentração de cálcio (Ca), sódio (Na), fósforo (P), potássio (K) e magnésio (Mg) foram analisados pelo PROC MIXED, utilizando arranjo fatorial, considerando como fatores os grupos (grupo das éguas gestantes de produtos equinos (GE), produtos muares (GM) e produtos equinos clones (GCL)) e o tempo (expresso em dias antes do parto D-6, D-5, D-4, D-3, D-2, D-1 e o dia do parto (D0)), além da interação entre eles. Os valores de escores analisados relacionados ao relaxamento da vulva e dos ligamentos sacroisquiáticos foram obtidos a partir de uma média entre a avaliação *in vivo* e as avaliações triplo-cego. O nível de significância considerado foi de 5%. As variáveis que

apresentaram efeito significativo foram analisadas pelo teste de Tukey. Para a comparação entre os pH em fitas colorimétricas antes da congelação e após a descongelação foi realizado teste t. Para determinação da correlação entre pH em fitas colorimétricas e pHmetro, foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Avaliação dos parâmetros físicos das éguas no pré-parto

Ao se comparar a média obtida entre os escores obtidos pelo avaliador *in vivo* e pelos triplo-cegos em relação ao relaxamento vulvar, houve interação entre grupo e tempo de coleta. No grupo GE, o D0 apresentou média maior que D-3, D-4, D-5 e D-6, mas iguais ao D-1 e D-2. No grupo GM, o D0 apresentou média maior em relação a qualquer outro tempo. Já no grupo GCL, as médias no D0, D-1, D-2 e D-3 foram iguais, enquanto as menores médias foram vistas em D-4, D-5 e D-6. Não houve diferença entre os grupos ao longo dos tempos. Os valores médios e erros padrão são descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias  $\pm$  erros padrão dos escores de relaxamento vulvar de éguas pré-parto ao longo dos tempos, entre os grupos.

	TEMPOS						
	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0
<b>GE</b>	1,70 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	1,67 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	2,13 $\pm$ 0,09 <sup>bc</sup>	2,25 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	2,47 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	2,43 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	2,81 $\pm$ 0,08 <sub>a</sub>
<b>GM</b>	1,88 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	2,04 $\pm$ 0,06 <sup>cd</sup>	2,09 $\pm$ 0,06 <sup>cd</sup>	2,18 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	2,26 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	2,51 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,79 $\pm$ 0,05 <sub>a</sub>
<b>GCL</b>	1,50 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	1,75 $\pm$ 0,10 <sup>d</sup>	2,02 $\pm$ 0,15 <sup>bcd</sup>	2,34 $\pm$ 0,16 <sup>abc</sup>	2,33 $\pm$ 0,10 <sup>abc</sup>	2,62 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	2,68 $\pm$ 0,23 <sub>a</sub>

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística ( $P < 0,05$ )

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muare; GCL: gestações de clones equinos; D-6: 6 dias antes do parto, D-5: 5 dias antes do parto, D-4: 4 dias antes do parto, D-3: 3 dias antes do parto, D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto, D0: dia do parto

Quanto ao relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos, houve interação entre grupo e tempo de coleta ( $p < 0,0001$ ). Entre as éguas do grupo GE, os maiores escores avaliados se concentraram no D0, D-1 e D-2 e os menores igualmente nos outros dias. No grupo GM, a média do D0 se equipalou ao D-1, D-2, D-3 e D-4. Já no grupo GCL, o escore em D0 foi igual ao D-1, D-2 e D-3, os quais foram maiores que D-5 e D-6. Não houve diferença entre os grupos ao longo dos tempos (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias  $\pm$  erros padrão dos escores de relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos de éguas pré-parto ao longo dos tempos, entre os grupos.

	TEMPOS						
	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0
<b>GE</b>	1,53 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	1,62 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	1,90 $\pm$ 0,11 <sup>bc</sup>	1,95 $\pm$ 0,14 <sup>bc</sup>	2,30 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	2,18 $\pm$ 0,12 <sub>ab</sub>	2,48 $\pm$ 0,13 <sub>a</sub>
<b>GM</b>	1,86 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	1,88 $\pm$ 0,12 <sup>bc</sup>	2,04 $\pm$ 0,11 <sup>abc</sup>	2,15 $\pm$ 0,09 <sup>abc</sup>	2,19 $\pm$ 0,11 <sup>abc</sup>	2,35 $\pm$ 0,11 <sub>ab</sub>	2,51 $\pm$ 0,10 <sub>a</sub>
<b>GCL</b>	1,44 $\pm$ 0,10 <sup>d</sup>	1,80 $\pm$ 0,11 <sup>cd</sup>	2,00 $\pm$ 0,10 <sup>bc</sup>	2,25 $\pm$ 0,12 <sup>abc</sup>	2,33 $\pm$ 0,15 <sup>abc</sup>	2,53 $\pm$ 0,11 <sub>ab</sub>	2,75 $\pm$ 0,13 <sub>a</sub>

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muare; GCL: gestações de clones equinos; D-6: 6 dias antes do parto, D-5: 5 dias antes do parto, D-4: 4 dias antes do parto, D-3: 3 dias antes do parto, D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto, D0: dia do parto

### 3.3.2 Avaliação de pH das amostras de secreções mamárias pré-congelação e pós-descongelação em fitas colorimétricas

Os valores de pH obtidos antes da congelação das amostras das secreções mamárias em fitas colorimétricas não sofreram efeito de interação, no entanto houve efeito de tempo e de grupo. O pH foi menor no dia do parto quando comparado a qualquer outro tempo. O D-4, D-5 e D-6 foram maiores do que o D-1 e D-2, enquanto o D-3 foi igual a todos esses tempos (Tabela 4). Em relação aos grupos, as médias foram maiores no grupo da GE do que nos grupos GM e GCL, os quais não tiveram diferenças entre si (Tabela 5). Já após a descongelação das amostras, não houve efeito de interação e de grupo, mas sim de tempo. Valores de pH maiores foram vistos no D-6, D-5, D-4, D-3 e D-2 do que no D-1 e D0 (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias  $\pm$  erros padrão das mensurações de pH em fitas colorimétricas pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto, entre os tempos

	TEMPOS							P
	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0	
<b>pH pré-congelação</b>	6,28 <sub><math>\pm</math>0,04<sup>a</sup></sub>	6,28 <sub><math>\pm</math>0,04<sup>a</sup></sub>	6,26 <sub><math>\pm</math>0,04<sup>a</sup></sub>	6,18 <sub><math>\pm</math>0,04<sup>ab</sup></sub>	6,12 <sub><math>\pm</math>0,05<sup>ab</sup></sub>	6,02 <sub><math>\pm</math>0,05<sup>b</sup></sub>	5,70 <sub><math>\pm</math>0,04<sup>c</sup></sub>	<0,0001
<b>pH pós-descongelação</b>	7,45 <sub><math>\pm</math>0,13<sup>a</sup></sub>	7,36 <sub><math>\pm</math>0,13<sup>a</sup></sub>	7,40 <sub><math>\pm</math>0,12<sup>a</sup></sub>	7,26 <sub><math>\pm</math>0,13<sup>a</sup></sub>	7,10 <sub><math>\pm</math>0,12<sup>a</sup></sub>	6,53 <sub><math>\pm</math>0,10<sup>b</sup></sub>	6,08 <sub><math>\pm</math>0,07<sup>b</sup></sub>	<0,0001

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras diferentes representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

D-6: 6 dias antes do parto, D-5: 5 dias antes do parto, D-4: 4 dias antes do parto, D-3: 3 dias antes do parto, D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto, D0: dia do parto

Tabela 5 - Médias  $\pm$  erros padrão das mensurações de pH em fitas colorimétricas pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto, entre os grupos

	GRUPOS			P
	GE	GM	GCL	
<b>pH pré-congelação</b>	6,26 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	6,05 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	6,08 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,03
<b>pH pós-descongelação</b>	7,06 $\pm$ 0,11	7,10 $\pm$ 0,07	6,67 $\pm$ 0,09	0,14

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras diferentes representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muares; GCL: gestações de clones equinos

Ao se comparar os valores de pH em fitas colorimétricas antes da congelação e após a descongelação, encontrou-se diferença entre as médias obtidas, o qual após a descongelação obteve-se uma média maior (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação entre as médias  $\pm$  erros padrão do pH em fitas colorimétricas pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias

COMPARAÇÃO		
pH pré-congelação	pH pós-descongelação	P
6,11 $\pm$ 0,02	6,99 $\pm$ 0,05	<0,0001

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

### 3.3.3 Avaliação de pH das amostras de secreções mamárias pós-descongelação em pHmetro

Não houve efeito de interação entre grupo e dia das coletas, porém houve efeito de tempo (Tabela 7) e grupo (Tabela 8). O D0 foi o dia com a menor média obtida em relação a todos os outros dias. Em relação aos grupos, o grupo GE e GM não tiveram diferenças entre si e obtiveram valores mais altos de pH. Já o grupo GCL apresentou os menores valores de pH em pHmetro.

Tabela 7 - Médias  $\pm$  erros padrão dos valores de pH em pHmetro obtidas a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas pré-parto entre os tempos

	TEMPOS							P
	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0	
<b>pH em pHmetro pós-descongelação</b>	8,17 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	8,19 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	8,15 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	8,00 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	7,84 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	7,34 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	6,77 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	<0,0001

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras diferentes representam diferença estatística ( $P < 0,0001$ ).

D-6: 6 dias antes do parto, D-5: 5 dias antes do parto, D-4: 4 dias antes do parto, D-3: 3 dias antes do parto, D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto, D0: dia do parto

Tabela 8 - Médias  $\pm$  erros padrão dos valores de pH em pHmetro obtidas a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas entre os grupos

	GRUPOS			P
	GE	GM	GCL	
<b>pH em pHmetro pós-descongelação</b>	7,89 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	7,83 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	7,38 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,04

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muare; GCL: gestações de clones equinos

O grau de relação entre os valores de pH obtidos em fitas colorimétricas e pHmetro foi de 0,94 ( $p < 0,0001$ ).

### 3.3.4 Concentração de sólidos totais por meio de refratômetro de BRIX pré-congelação e pós-descongelação das amostras de secreção mamária

Não houve efeito de grupo (Tabela 10) e de interação entre grupo e tempo, mas houve efeito de tempo tanto para as análises das amostras das secreções mamárias antes da congelação, quanto após a descongelação (Tabela 9). O índice BRIX antes da congelação no D0, D-1, D-2 e D-3 foram iguais e maiores do que o D-4, D-5 e D-6, dias estes que foram iguais entre si. Após a descongelação das amostras, encontrou-se médias maiores em D0 do que em D-2, D-3, D-4, D-5 e D-6.

Tabela 9 - Médias  $\pm$  erros padrão das mensurações do índice BRIX pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto entre os tempos (resultados expressos em porcentagem)

	TEMPOS							P
	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0	
<b>Índice BRIX pré-congelação</b>	17,58 $\pm$ 2,48 <sup>b</sup>	18,66 $\pm$ 2,42 <sup>b</sup>	18,18 $\pm$ 2,29 <sup>b</sup>	19,02 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup>	19,57 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	21,57 $\pm$ 2,27 <sup>a</sup>	24,86 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	0,0009
<b>Índice BRIX pós-descongelação</b>	15,76 $\pm$ 1,57 <sup>d</sup>	15,65 $\pm$ 1,54 <sup>d</sup>	16,51 $\pm$ 1,40 <sup>dc</sup>	18,03 $\pm$ 1,45 <sup>dc</sup>	19,46 $\pm$ 1,33 <sup>bc</sup>	22,32 $\pm$ 1,15 <sup>ab</sup>	24,88 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	<0,0001

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras diferentes representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

D-6: 6 dias antes do parto, D-5: 5 dias antes do parto, D-4: 4 dias antes do parto, D-3: 3 dias antes do parto, D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto, D0: dia do parto.



Tabela 10 - Médias  $\pm$  erros padrão das mensurações do índice BRIX pré-congelação e pós-descongelação das amostras das secreções mamárias de éguas pré-parto entre os grupos (resultados expressos em porcentagem)

	GRUPOS			P
	GE	GM	GCL	
Índice BRIX pré-congelação	x	16,21 $\pm$ 1,19	21,56 $\pm$ 1,09	0,07
Índice BRIX pós-descongelação	16,92 $\pm$ 1,03	19,45 $\pm$ 0,71	21,26 $\pm$ 1,15	0,19

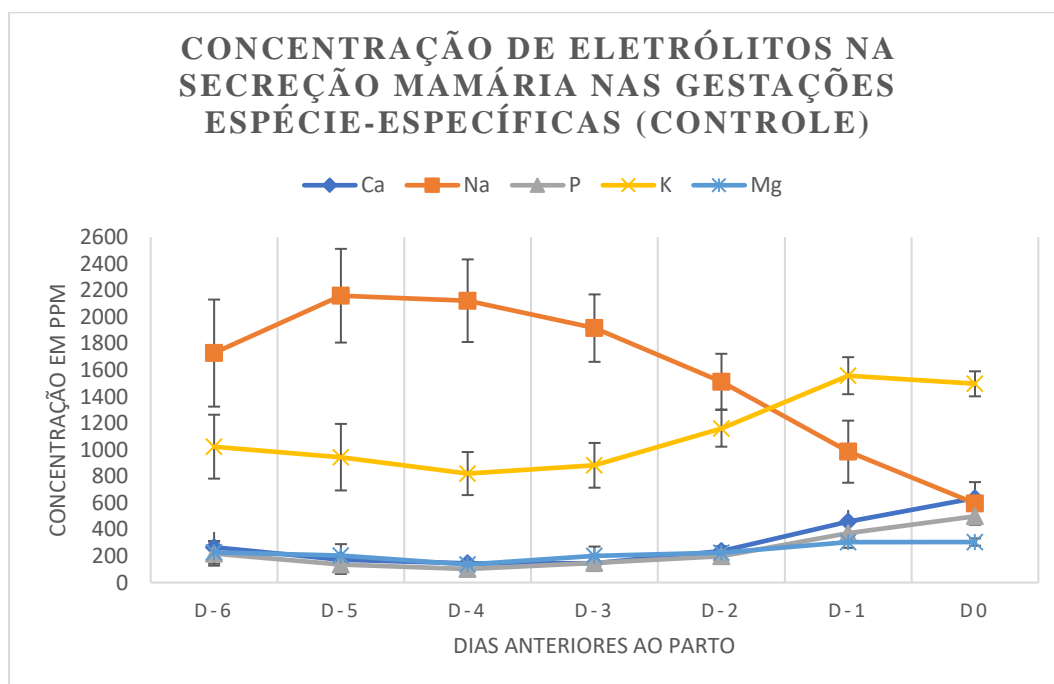
Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muares;  
GCL: gestações de clones equinos; x: não houve mensuração do índice BRIX do GE.

### 3.3.5 Concentração de eletrólitos das secreções mamárias das éguas no pré-parto

As médias e o erro padrão dos resultados das mensurações de eletrólitos obtidos do GE, GM e GCL estão descritos na seção Apêndices (Apêndice A). Além disso, os dados obtidos do GE, GM e GCL foram dispostos no gráfico 1, gráfico 2 e gráfico 3, respectivamente.

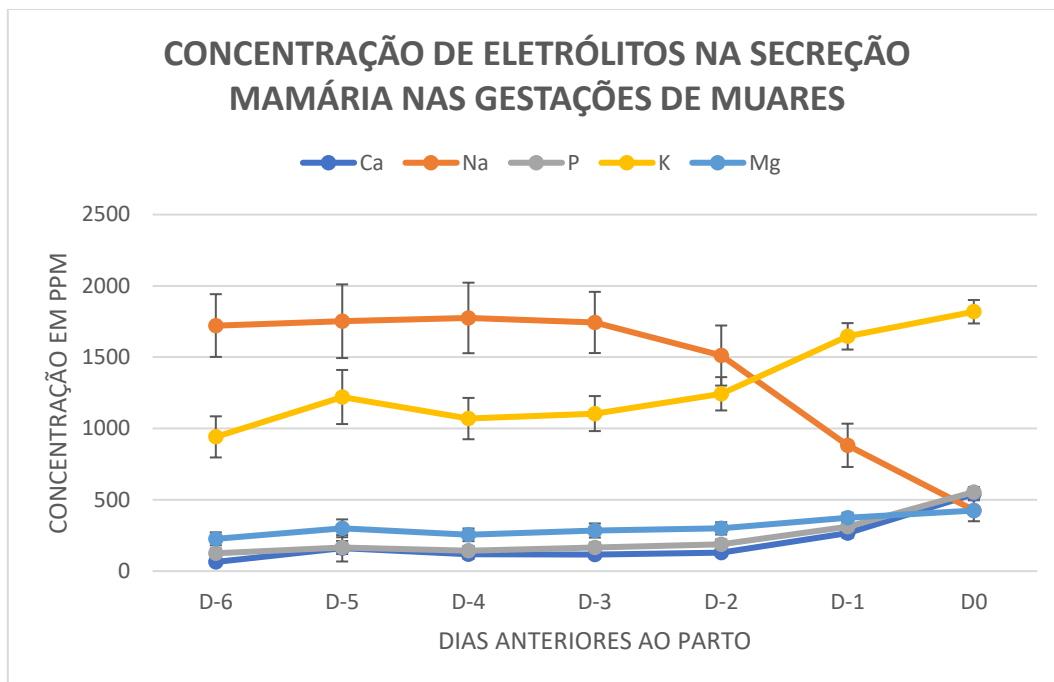
Gráfico 1 - Médias  $\pm$  erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos equinos (resultados expressos em partes por milhão)



Fonte: (OCTAVIANO, 2021)

GE: gestações espécie-específicas (controle); D-6: 6 dias antes do parto; D-5: 5 dias antes do parto; D-4: 4 dias antes do parto; D-3: 3 dias antes do parto; D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto; D0: dia do parto; ppm: partes por milhão.

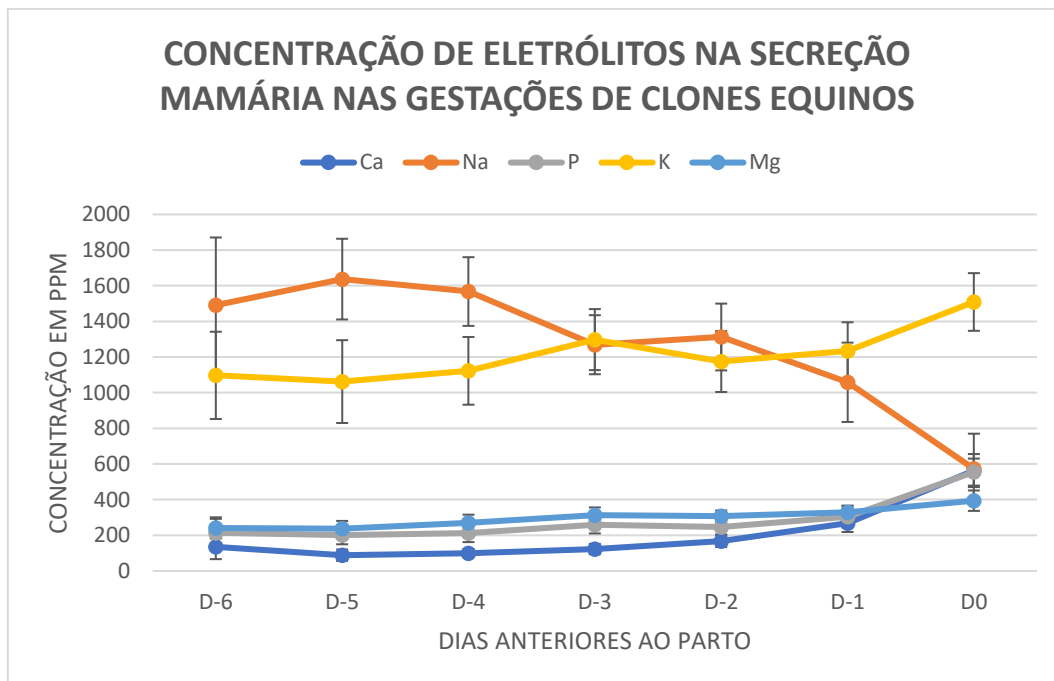
Gráfico 2 - Médias  $\pm$  erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos muares (resultados expressos em partes por milhão)



Fonte: (OCTAVIANO, 2021)

GM: gestações de muares; D-6: 6 dias antes do parto; D-5: 5 dias antes do parto; D-4: 4 dias antes do parto; D-3: 3 dias antes do parto; D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto; D0: dia do parto; ppm: partes por milhão.

Gráfico 3 - Médias  $\pm$  erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos equinos clones (resultados expressos em partes por milhão)



Fonte: (OCTAVIANO, 2021)

GCL: gestações de clones equinos; D-6: 6 dias antes do parto; D-5: 5 dias antes do parto; D-4: 4 dias antes do parto; D-3: 3 dias antes do parto; D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto; D0: dia do parto; ppm: partes por milhão.

Quanto as médias obtidas em relação a todos os eletrólitos avaliados nas secreções mamárias, foram encontradas diferenças entre os tempos ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 14), mas não efeito de grupo (Tabela 15) e interação.

No D0, o valor médio de Ca foi maior quando comparado a todos os outros tempos. Além disso, o D-1 também foi maior que D-2, D-3, D-4, D-5 e D-6, dias os quais não apresentaram diferenças entre si. Em relação ao Na, o D-6, D-5, D-4, D-3 e D-2 não se diferiram entre si e obtiveram as maiores médias comparadas ao D-1 e D0. O D0 foi o dia com a menor média entre os tempos. O P no D0 apresentou a maior média, enquanto 1 dia antes do parto obteve-se uma média igual ao D-2, mas maior que D-3, D-4, D-5 e D-6. A média obtida no D0 na avaliação do K foi maior quando comparada ao D-2, D-3, D-4, D-5 e D-6, mas igual ao dia anterior ao parto. Por fim, as médias encontradas no D0 referentes às mensurações de Mg diferiram e foram menores comparadas ao D-3, D-4, D-5 e D-6, mas se equivaleram ao D-1 e D-2.

Tabela 11 - Médias  $\pm$  erros padrão dos valores de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio obtidos a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas pré-parto em relação aos tempos (resultados expressos em partes por milhão)

	TEMPOS							P
	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0	
<b>Ca</b>	134,50 $\pm 37,55^c$	136,45 $\pm 43,75^c$	120,71 $\pm 20,83^c$	125,85 $\pm 17,97^c$	174,03 $\pm 18,87^c$	315,55 $\pm 34,74^b$	573,27 $\pm 37,57^a$	<0,0001
<b>Na</b>	1663,67 $\pm 171,58^a$	1804,18 $\pm 156,84^a$	1814,79 $\pm 149,09^a$	1652,10 $\pm 130,87^a$	1459,61 $\pm 119,59^a$	946,57 $\pm 110,02^b$	503,76 $\pm 70,89^c$	<0,0001
<b>P</b>	172,47 $\pm 34,32^c$	171,81 $\pm 30,07^c$	150,94 $\pm 23,09^c$	187,26 $\pm 26,55^c$	207,17 $\pm 23,15^{bc}$	327,34 $\pm 29,31^b$	537,72 $\pm 28,81^a$	<0,0001
<b>K</b>	1002,81 $\pm 108,77^c$	1104,83 $\pm 125,04^c$	1013,56 $\pm 94,20^c$	1102,66 $\pm 87,52^c$	1199,87 $\pm 77,85^{bc}$	1539,59 $\pm 72,53^{ab}$	1666,62 $\pm 62,05^a$	<0,0001
<b>Mg</b>	230,42 $\pm 33,23^c$	257,53 $\pm 36,13^{bc}$	224,78 $\pm 26,27^c$	271,18 $\pm 31,50^{bc}$	279,92 $\pm 25,19^{abc}$	346,15 $\pm 23,05^{ab}$	384,64 $\pm 20,01^a$	<0,0001

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

Letras diferentes representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

Ca: cálcio; Na: sódio; P: fósforo; K: potássio; Mg: magnésio; D-6: 6 dias antes do parto, D-5: 5 dias antes do parto, D-4: 4 dias antes do parto, D-3: 3 dias antes do parto, D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto, D0: dia do parto

Tabela 12 - Médias  $\pm$  erros padrão dos valores de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio obtidos a partir das amostras de secreções mamárias descongeladas de éguas pré-parto entre os grupos (resultados expressos em partes por milhão)

	GRUPOS			P
	GE	GM	GCL	
<b>Ca</b>	328,09 $\pm$ 35,35	232,90 $\pm$ 21,83	193,31 $\pm$ 25,36	0,07
<b>Na</b>	1455,17 $\pm$ 114,74	1293,45 $\pm$ 84,75	1286,05 $\pm$ 89,14	0,79
<b>P</b>	263,63 $\pm$ 28,69	266,02 $\pm$ 19,60	277,93 $\pm$ 24,37	0,44
<b>K</b>	1178,63 $\pm$ 65,89	1354,73 $\pm$ 52,95	1208,83 $\pm$ 71,45	0,62
<b>Mg</b>	234,87 $\pm$ 20,21	322,46 $\pm$ 16,48	298,75 $\pm$ 17,25	0,07

Fonte: (OCTAVIANO, 2021).

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muare; GCL: gestações de clones equinos; Ca: cálcio; Na: sódio; P: fósforo; K: potássio; Mg: magnésio.

### 3.4 DISCUSSÃO

Poucos são os estudos disponíveis sobre as alterações dos parâmetros físicos que demonstram proximidade do parto na espécie equina no que se refere às GE e, quando se trata das GM e GCL, os trabalhos são nulos. Assim, o presente experimento compreende em um trabalho inédito nesses termos, ressaltando que o relaxamento vulvar e dos ligamentos sacroisquiáticos em ambos os grupos tiveram um aumento gradativo conforme ocorria a aproximação do dia do parto. Foi observado interação entre o grupo e o tempo em ambos os relaxamentos físicos avaliados, o que corrobora com a literatura que trata das éguas gestantes de produtos equinos (WESSEL, 2005; ELLERBROCK; CANISSO, 2016). Em relação ao relaxamento vulvar, apenas no grupo GM foi observado que o dia do parto diferia dos outros dias, enquanto nos outros grupos, o dia do parto apresentava médias iguais aos dias anteriores, o que dificulta o uso deste parâmetro isolado para a predição do parto, concordando desta forma com Brown Douglas et al. (2002). Além disso, uma outra questão que deve ser deixada clara, é que o sistema de escore pode sofrer influência do observador que está realizando a avaliação da égua gestante, justamente por se tratar de um parâmetro subjetivo, o que pode gerar resultados distintos entre os diferentes grupos de pesquisa.

Embora não se tenha mensurado hormônios neste estudo, a relaxina talvez possa estar envolvida no padrão observado no relaxamento vulvar na GM quanto ao que foi visto no dia do parto deste grupo. Isso porque, padrões hormonais diferentes são relatados na literatura em relação às gestações de muare, como por exemplo as menores concentrações de gonadotrofina coriônica equina (ALLEN, 1969; FRANCESCA; LENNARD; ALLEN, 1995; BOETA; ZARCO, 2005). Em relação às concentrações séricas de relaxina, menores concentrações são esperadas nas gestações de jumentas quando comparada às gestações espécie-específicas, mas infelizmente não existem dados sobre seu comportamento nas gestações híbridas de muare, em que a placenta possui características genéticas híbridas, assim como o produto. Como nas éguas a relaxina é produzida também pela placenta, Stewart et al. (1992) sugeriu em estudo que as concentrações de relaxina poderiam refletir a função placentária. Sabendo que as gestações de clones equinos são muitas vezes acompanhadas de alterações placentárias (POZOR et al., 2016), poderia haver uma diferença entre o grupo GCL e os grupos GM e GE, o que não foi observado, embora numericamente médias menores de relaxamento tenham sido atribuídas a essas éguas.

A utilização das fitas colorimétricas mostrou de grande valia, como uma forma simples, rápida e barata de ser aplicada a campo. Isso porque, com as secreções mamárias frescas, no dia do parto obteve-se menor pH, além da detecção de diferença em relação a qualquer outro dia avaliado, no intervalo de seis dias pré-parto até o nascimento. O estudo de Korosue et al. (2013) demonstrou que o pH em 6,4 indica proximidade do parto. No entanto, no presente estudo, a média encontrada no D0 foi de  $5,7 \pm 0,04$ , e nem mesmo 6 dias antes do parto obteve-se pH 6,4, e sim uma média de  $6,28 \pm 0,04$ , ou seja, bem mais baixa do que o observado por Korosue et al. (2013), 24 horas antes do parto. As médias encontradas também foram menores do que as relatadas por Canisso et al., 2013, que demonstraram que a maioria das éguas com  $\text{pH} \leq 7$  pariam em 24 horas. O grupo GE apresentou valor médio de pH maior que o grupo GM e GCL. O mecanismo pelo qual ocorre a diminuição do pH nas secreções mamárias ainda não está elucidado na literatura e, por este motivo, o presente estudo não explica a diferença vista entre os grupos, mas aparentemente o produto ou a placenta pode de alguma forma interferir neste parâmetro. Assim, estudos ao redor da histologia e esteroidogênese placentária poderiam ser de grande valia na elucidação deste mecanismo ou ao menos iniciar o conhecimento sobre o assunto.

De qualquer modo, o presente estudo vai de acordo com os trabalhos já publicados (CANISSO et al., 2013; ELLERBROCK; CANISSO, 2016) em relação ao uso das fitas colorimétricas para a mensuração do pH das secreções mamárias, demonstrando também a sua importância na predição do parto, além da sua praticidade.

Foi observado que a congelação das amostras afetou diretamente o pH delas, já que a média de pH obtida foi significativamente maior quando comparada a média pré congelação. O inverso foi visto em um estudo realizado por Pinto Júnior et al. (2012) os quais avaliaram o efeito de diferentes tempos de congelação sobre as propriedades físico-químicas do leite de cabra em diferentes fases de lactação. Neste estudo, observou-se que a congelação influenciou o pH dos leites congelados das cabras, os quais apresentaram valores mais baixos de pH conforme o tempo da congelação da amostra aumentava, fato este atribuído à possível precipitação de sais da amostra. No entanto, algumas diferenças devem ser destacadas entre o presente trabalho e o estudo de Pinto Júnior et al. (2012), sendo elas, principalmente, a espécie animal, as fases de lactação em que as cabras se enquadravam (entre 55 dias e 125 dias, divididas em 4 grupos) e a utilização de pHmetro.

Após a descongelação das amostras, na avaliação do pH com o pHmetro, o grupo das gestações de clones equinos obteve menor valor quando comparado ao grupo GM e GE, o que não foi observado ao se avaliar em fitas colorimétricas. Assim, temos que ressaltar 2 situações: a primeira seria o fato da possível não confiabilidade dos dados pós descongelação pela clara alteração do pH e segundo pela não concordância entre os dois métodos utilizados para a mensuração do pH pós descongelação. Infelizmente, não foi possível levar o pHmetro a campo, para realizar ambos os métodos antes da congelação das amostras e desta forma, realizar a comparação entre as metodologias.

Em relação às concentrações de sólidos totais mensuradas em refratômetro de BRIX nas secreções mamárias antes das suas congelações, a partir de 3 dias antes do parto até o dia do parto, foi visto um aumento nas médias observadas entre os animais no decorrer dos dias, o que pode realmente estar relacionado a concentração de imunoglobulinas no úbere e com a qualidade colostrálica. Todos os grupos avaliados não obtiveram diferenças em relação às médias obtidas, o que pode significar que o mecanismo de concentração de imunoglobulinas no úbere é indiferente ao tipo de parto gestado pela égua. Após a descongelação das amostras, o D0 e D-1 obtiveram maiores médias de índice BRIX, o que poderia ser também um indicativo de parto iminente. Infelizmente, assim como observado por Korosue et al. (2013), foi vista uma grande variação entre éguas em relação a este parâmetro, com valores entre 8% e 36,5% no dia

do parto, o que demonstra desta forma não ser de grande valia na predição do parto. Assim, o índice BRIX pode ter seu valor ao ser relacionado à qualidade colostrar e à concentração de imunoglobulinas presente no colostro (CASH, 1999), mas ao tentar utilizá-lo isoladamente como um método para a predição do parto, pouca eficácia foi observada nas éguas do estudo.

Após a descongelação das amostras de secreção mamárias, o pH em pHmetro foi menor no dia do parto quando comparados a qualquer outro dia. Desta forma, mesmo após a descongelação das amostras, o pHmetro, assim como a fita colorimétrica foi capaz de detectar o dia do parto. No entanto, na comparação entre ambos os métodos, o pHmetro foi considerado menos prático do que as fitas colorimétricas de pH, como relatado também por Canisso et al. (2013). Além disso, devido à pequena quantidade de amostra possível de ser colhida das éguas nos dias anteriores do parto, a fita de pH, possui outra vantagem sobre o pHmetro, já que para a sua utilização necessita de apenas uma gota de secreção mamaria *versus* 1 ml para o pHmetro. É importante ressaltar que ambos os métodos de mensuração de pH tiveram uma forte correlação positiva.

Com relação aos eletrólitos, o Ca é mais descrito na literatura como bom preditivo, já que suas concentrações aumentam com a proximidade do parto, conforme observado por Peaker et al. (1979), Leadon; Jeffcott e Rossdale (1984), Ousey; Dudan e Rossdale, (1984), Ley et al. (1989), Brown Douglas et al. (2002), Canisso et al. (2013), Korosue et al. (2013). No presente estudo, o Ca aumentou gradativamente com a proximidade do parto e observou-se que as éguas obtiveram maiores concentrações de Ca no dia do parto quando comparado a qualquer outro dia, o que vai de acordo com a literatura. Um comportamento interessante encontrado nos grupos GM e GCL foi o aumento de 102,13% e 110,66%, respectivamente, nas concentrações médias de cálcio do D-1 para o D0, o que não foi visto nas grupo GE (aumento de 38,29%). Embora os mecanismos exatos envolvidos na lactação não estejam determinados, sabe-se que o desenvolvimento mamário na época do parto coincide com a queda de progesterona e estrógeno e com acentuado aumento de prolactina, hormônio também responsável pelo desenvolvimento do comportamento materno (LANDIM-ALVARENGA; PRESTES, 2017). Talvez diferenças na unidade feto-placentária possam alterar esse perfil hormonal e serem responsável por este acontecimento. Assim, por mais este motivo, estudos da esteroidogênese placentária nas gestações de produtos muares e de clones equinos poderiam auxiliar na elucidação deste mecanismo.

Em outros países que não o Brasil, existem disponíveis comercialmente kits para análise de Ca de soluções. Paccamonti (2001) afirma em seu artigo que o melhor método para determinar a prontidão do potro para nascimento é a mensuração do Ca, Na e K, mas ao se utilizar kits comerciais para a finalidade de predição de parto, o kit deve apenas ser específico para a mensuração do Ca devido a sua melhor e maior relação com a predição do parto. Assim, a disponibilidade de métodos práticos que consigam ser realizados a campo no Brasil pode contribuir para que haja um aumento nos monitoramentos dos partos na espécie equina, ainda mais sabendo que o Ca possui uma boa relação com o momento do parto.

No D0, a concentração de Na na secreção mamária foi a menor quando comparada a qualquer outro dia (503,76 ppm ou 21,9 mmol/L) enquanto o K obteve média maior no dia do parto 1666,62 ppm ou 42,73 mmol/L, estando ambos os eletrólitos de acordo com a literatura (OUSEY; DUDAN e ROSSDALE, 1984; BROWN DOUGLAS et al., 2002; CANISSO et al., 2013). Assim, esses eletrólitos também demonstraram uma relação positiva com a proximidade do parto.

Na utilização do sistema de escores proposto por Ousey; Dudan e Rossdale (1984), que utiliza como base as concentrações de Ca, Na e K na secreção mamária (Tabela 1), os 3 grupos no D0 teriam pontuado 45 pontos, o que segundo os autores significa que o parto aconteceria nas próximas 24 horas. No dia anterior ao parto, o grupo GE, GM e GCL obtiveram 45, 35 e 25 pontos, respectivamente. Avaliando esses números, os dois primeiros grupos teriam a chance de parto em 24 horas e no último grupo, nas próximas 72 horas. Desta forma, o sistema de escore se mostra impreciso no D-1, mas no D0 o sistema realmente auxiliou na determinação da proximidade do parto.

Quanto à mensuração de Mg, a curva de aumento das suas concentrações médias ocorreu de acordo com o observado por Canisso et al. (2013). As maiores médias foram vistas no D0, D-1 e D-2, em que houve um aumento significativo no D0 quando comparado a 3, 4, 5 e 6 dias antes do parto. As mensurações de P nas secreções mamárias a fim de predizer o parto não foram encontradas na literatura, embora o P tenha alcançado um valor médio maior no D0, assim como o Ca. Bleul et al. (2006) demonstraram em vacas que este eletrólito tem um aumento significativo com a proximidade do parto e o considerou como uma das maiores variáveis para a determinação do parto na espécie. Desta forma, ao nosso conhecimento esta é a primeira vez que este eletrólito é descrito na secreção mamária da espécie equina com o objetivo de predizer o parto, e talvez a



inclusão do P no painel de eletrólitos a serem avaliados, possa ser de valia na assertividade do monitoramento gestacional.

Assim, após as análises foi possível observar que nos parâmetros físicos avaliados nas éguas houve um crescente relaxamento ao longo dos dias com o aproximar do parto em todos os grupos, mas apenas nas gestações de muares foi visto que no dia do parto há um maior relaxamento vulvar que difere de outros dias. Já quanto às mensurações de pH, foi possível observar que o pH em fitas colorimétricas se mostrou um grande aliado na predição do parto, já que por meio dele foi possível observar a diminuição do pH gradativa até o dia da parição. Além disso, o grupo das gestações de produtos muares e clones equinos apresentaram menores valores de pH quando comparados ao grupo controle quando utilizada fitas colorimétricas, o que pode significar alguma interferência da genética do produto na redução do pH das secreções mamárias. A congelação das amostras claramente alterou o pH das secreções mamárias, o que alterou os valores médios de pH de todos os grupos. O pH em fitas colorimétricas antes da congelação das amostras e o pH em pHmetro após a descongelação das amostras foram os únicos parâmetros que demonstraram diferenças entre os grupos. O índice BRIX não demonstrou importância na predição do parto em nenhum grupo devido a grande variação entre as éguas do experimento, mas que pode ter um valor importante relacionando a qualidade colostrálica. As mensurações das concentrações de eletrólitos também demonstraram ter uma boa relação com o momento do parto, mas infelizmente um tanto quanto trabalhoso, já que as amostras tiveram que ser digeridas antes de serem avaliadas no ICP, instrumento esse caro e pouco acessível. Com o advento de testes rápidos para mensuração de eletrólitos, essas mensurações poderiam ser incorporadas facilmente e possivelmente com êxito no cotidiano, acrescentando no rol de eletrólitos o fosforo, pela primeira vez relatado neste trabalho como um preditor do parto em equídeos.

### 3.5 CONCLUSÕES

Os parâmetros físicos avaliados nas éguas tiveram um crescente relaxamento ao longo dos dias com o aproximar do parto em todos os grupos, mas apenas nas gestações de muares o dia do parto obteve um relaxamento maior quanto comparado aos dias anteriores ao parto, o que facilita a predição do parto nesta categoria de animais e auxilia o Médico Veterinário a campo determinar o dia real do nascimento do potro. A mensuração de pH em fitas colorimétricas se mostrou um grande aliado na predição do parto, já que por meio dele foi possível observar a diminuição do pH gradativa até o dia da parição em um método simples e fácil de ser realizado a campo. No dia do parto, tanto o grupo das éguas gestantes de produtos muares, quanto as de produtos clones equinos apresentaram menores valores de pH, diferente do que foi visto no grupo controle de éguas gestantes de produtos equinos, sendo então um dado importante na predição do parto nestas gestações. Quanto a utilização do pHmetro na análise das amostras após a descongelação, apenas no GCL foi detectado menores valores de pH. Mas, é importante ressaltar que a congelação das amostras de secreção mamárias claramente alterou seus valores de pH, o que resultou neste último padrão observado. O índice BRIX não se mostrou um bom preditor em nenhum dos grupos. As mensurações das concentrações de eletrólitos demonstraram ótima relação com o momento do parto, sendo então consideradas boas preditoras do parto na espécie equina.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. Factors influencing pregnant mare serum gonadotrophin production. **Nature Publishing Group**, v. 223, p. 64–66, 1969.
- ALLEN, W. R. et al. Inter and Extraspecies Equine Pregnancies. In: **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 2302–2319, 2011.
- ANDERSON, G. B. Interspecific Pregnancy: Barriers and Prospects. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 1, p. 1–15, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod38.1.1>>. Acesso em: 06 de julho de 2020
- BLEUL, U. et al. Electrolytes in bovine parturition mammary secretions and their usefulness for predicting parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 3059–3065, 2006.
- BOAKARI, Y. L. et al. Are mule pregnancies really longer than equine pregnancies? Comparison between mule and equine pregnancies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 6, p. 823–827, 2019.
- BOETA, M.; ZARCO, L. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, n. 12, p. 531–538, 2005.
- BRINSKO, S. P. et al. Management of the pregnant mare. In: **Manual of Equine Reproduction**. 3. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2011. p. 114–130.
- BROWN DOUGLAS, C. G. et al. Prediction of foaling using mammary secretion constituents. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 50, n. 3, p. 99–103, 2002.
- BYRON, C. R. et al. Dystocia in a referral hospital setting: approach and results. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 1, p. 82–85, 2002.
- CANISSO, I. F. et al. Decreasing pH of mammary gland secretions is associated with parturition and is correlated with electrolyte concentrations in prefoaling mares. **Veterinary Record**, v. 173, n. 9, p. 218, 2013.
- CASH, R. S. G. Colostral quality determined by refractometry. **Equine Veterinary Education**, v. 11, n. 1, p. 36–38, 1999.
- CHAVATTE-PALMER, P. et al. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta**, v. 26, p. S99–S104, 2012.
- CHAVATTE, P. et al. Field Determination of Colostrum Quality by Using a Novel, Practical Method. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 44, p. 206–209, 1998.
- CHRISTENSEN, B. W. Parturition. In: **Equine Reproduction**. 2. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2011. p. 2268–2276.

DAVIES MOREL, M. C. G.; NEWCOMBE, J. R.; HOLLAND, S. J. Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. **Animal Reproduction Science**, v. 74, p. 175–185, 2002.

ELLERBROCK, R. E.; CANISSO, I. F. How to interpret pH profiles of mammary gland secretions to predict imminent parturition in mares. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners Annual Conference**, v. 62, p. 187–192, 2016.

FRANCESCA, S.; LENNARD, S. N.; ALLEN, W. R. Mechanisms Controlling Formation of the Equine Chorionic Girdle1. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p. 151–159, 1995.

GAMBINI, A. et al. Equine Cloning: In Vitro and In Vivo Development of Aggregated Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 1, p. 1–9, 2012.

GIGER, R.; MEIER, H. P.; KÜPFER, U. Length of gestation of Freiburger mares with mule and horse foals. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 139, n. 7, p. 303–307, 1997.

HILL, J. R. et al. Placental Anomalies in a Viable Cloned Calf. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 83–88, 2001.

KITADE, K. et al. Expression and localization of carbonic anhydrase in bovine mammary gland and secretion in milk. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134, p. 349–354, 2003.

KLEIN, C. The role of relaxin in mare reproductive physiology: A comparative review with other species. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 451–456, 2016.

KOROSUE, K. et al. Comparison of pH and refractometry index with calcium concentrations in preparturient mammary gland secretions of mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 2, p. 242–248, 2013.

KOROSUE, K. Testing mammary gland secretions to help predict when a mare will foal. **Veterinary Record**, v. 173, n. 9, p. 216–217, 2013.

KURTZ FILHO, M. et al. Duração da gestação em relação à idade de éguas da raça Puro Sangue de Corrida, aos pesos do potro e da placenta, e ao horário do parto. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 1, p. 37–40, 1997.

LANDIM-ALVARENGA, F. Parto normal. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 69-80, 2017.

LANDIM-ALVARENGA, F.; PRESTES, N. C. Lactação e Patologias da Glândula mamária. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, p. 81-85, 2017.

LEADON, D. P.; JEFFCOTT, L. B.; ROSSDALE, P. D. Mammary secretions in normal spontaneous and induced premature parturition in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 256–259, 1984.

- LESTER, B. W. Prematurity, Dysmaturity and Assessment of Maturity. In: **Equine Reproduction**. 2. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 121-127, 2011.
- LEY, W. B. et al. Daytime management of the mare. 1: Pre-foaling mammary secretions testing. **Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 2, 1989.
- LEY, W. B. et al. The sensitivity, specificity and predictive value of measuring calcium carbonate in mares prepartum mammary secretions. **Theriogenology**, v. 40, p. 189–198, 1993.
- MASERATI, M.; MUTTO, A. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 42–50, 2016.
- MCCUE, P. M.; FERRIS, R. A. Parturition, dystocia and foal survival: A retrospective study of 1047 births. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. SUPPL. 41, p. 22–25, 2012.
- MCCUE, P. M.; MCKINNON, A. O. Pregnancy examination. In: **Equine Reproduction**. 2. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 2245–2261, 2011.
- OUSEY, J. C.; DUDAN, F.; ROSSDALE, P. D. Preliminary studies of mammary secretions in the mare to assess foetal readiness for birth. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 259–263, 1984.
- PACCAMONTI, D. L. Milk electrolytes and induction of parturition. **Pferdeheilkunde**, v. 17, n. 6, p. 616–618, 2001.
- PEAKER, M. et al. Changes in mammary development and the composition of secretion during late pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. Suppl. 27, n. February 1979, p. 555–561, 1979.
- PINTO JÚNIOR, W. R. et al. Efeito do congelamento sobre os parâmetros físico-químicos do leite de cabras da raça Saanen. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 110–117, 2012.
- POZOR, M. A. et al. Placental abnormalities in equine pregnancies generated by SCNT from one donor horse. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1573–1582, 2016.
- PRESTES, N. C. O parto distócico e as principais emergências obstétricas em equinos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 3, n. 2, p. 40–46, 2000.
- RIBEIRO, P. et al. Principais diferenças fenotípicas e genéticas entre bardotos e muares. **Sinapse Múltipla**, v. 6, n. 2, p. 301–395, 2017.
- RICCIO, A. M. et al. Perinatal evaluation in mule (*Equus mulus mulus*) neonates – a comparison to equine. In: 18th International Congress on Animal Reproduction - ICAR, Tours. **Anais...** Tours: 2016.
- ROSSDALE, P. D. et al. Effects of placental pathology on maternal plasma progesterone and mammary secretion calcium concentrations and on neonatal adrenocortical function in the horse. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 44, p. 579–590, 1991.

RYAN, P. et al. Relaxin as a biochemical marker of placental insufficiency in the horse : a review. **Pferdeheilkunde**, v. 15, p. 622–626, 1999.

RYAN, P.; VAALA, W.; BAGNELL, C. Evidence that equine relaxin is a good indicator of placental insufficiency in the mare. **Proceedings 44th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners**, v. 44, p. 62–63, 1998.

STEWART, D. R. et al. Breed differences in circulating equine relaxin. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 648–652, 1992.

STEWART, D. R.; STABENFELDT, G. Relaxin activity in the pregnant mare. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 281–289, 1981.

VANDERWALL, D. K. et al. Equine cloning: Applications and outcomes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 91–98, 2006.

WAKCHAURE, R.; GANGULY, S. Advances in equine cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) technique in horses: A review. **International Journal of Bioassays**, v. 5, n. 12, p. 5124–5127, 2016.

WESSEL, M. Staging and Prediction of Parturition in the Mare. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, n. 3, p. 219–227, 2005.

## APÊNDICES

Apêndice A - Médias  $\pm$  erro padrão das concentrações de cálcio, sódio, fósforo, potássio e magnésio nas secreções mamárias pré-parto de éguas gestantes de produtos equinos, muare e clones equinos 6 dias antes do parto até o dia do parto (resultados expressos em partes por milhão)

Dias antes do parto	Ca			Na			P			K			Mg		
	GE	GM	GCL	GE	GM	GCL	GE	GM	GCL	GE	GM	GCL	GE	GM	GCL
<b>D-6</b>	264,64	64	135,4	1727,1	1722	1491,8	217,9	125,1	214,9	1022,8	941,2	1097,1	227,1	226,3	241,3
	$\pm 115,4$	$\pm 13,9$	$\pm 69,3$	$\pm 402,9$	$\pm 220$	$\pm 378,8$	$\pm 90,6$	$\pm 33,4$	$\pm 77,4$	$\pm 240,55$	$\pm 144,2$	$\pm 244,8$	$\pm 85,1$	$\pm 45,4$	$\pm 59,4$
<b>D-5</b>	170,9	160,4	88,3	2158,8	1752,3	1637	136,1	165,4	200,9	943,8	1220,9	1062,2	203,2	300,1	237
	$\pm 67,7$	$\pm 92,9$	$\pm 31,9$	$\pm 352,7$	$\pm 258,3$	$\pm 226,4$	$\pm 71,2$	$\pm 45,7$	$\pm 51,5$	$\pm 250,5$	$\pm 189,7$	$\pm 232,2$	$\pm 86,1$	$\pm 62,5$	$\pm 43,5$
<b>D-4</b>	144,7	118,4	100	2121,3	1775,4	1567,4	101,9	143,2	211,6	820,4	1069,7	1122,5	135,7	254,5	269,2
	$\pm 52,9$	$\pm 31,8$	$\pm 21,3$	$\pm 310,8$	$\pm 247,3$	$\pm 192,7$	$\pm 36,2$	$\pm 33,2$	$\pm 49,8$	$\pm 162$	$\pm 144,9$	$\pm 190$	$\pm 33,5$	$\pm 44,4$	$\pm 46,4$
<b>D-3</b>	146,5	115,6	122,7	1915	1743,7	1269	147,9	165,1	258,2	882,4	1104,6	1297,7	200	284,9	313,3
	$\pm 43,5$	$\pm 26,4$	$\pm 28,7$	$\pm 253,8$	$\pm 214,6$	$\pm 165,7$	$\pm 61,3$	$\pm 34,8$	$\pm 47,9$	$\pm 168,5$	$\pm 122,8$	$\pm 171,1$	$\pm 71,1$	$\pm 49,3$	$\pm 43,1$
<b>D-2</b>	237	130,5	167	1512,1	1511,7	1312,3	199,2	188,7	246,8	1160,8	1243,4	1174,8	224,6	299,6	308
	$\pm 42,2$	$\pm 19,5$	$\pm 32,9$	$\pm 209,8$	$\pm 210,7$	$\pm 187,4$	$\pm 48$	$\pm 33,4$	$\pm 42,3$	$\pm 138,2$	$\pm 116,9$	$\pm 170,9$	$\pm 49$	$\pm 42,9$	$\pm 31,2$
<b>D-1</b>	459,6	267,3	267,3	985	882,1	1058,2	371,1	311,5	303,2	1556,9	1646,3	1233,4	304,2	374,6	329,1
	$\pm 86,1$	$\pm 34,7$	$\pm 49$	$\pm 233,7$	$\pm 151,8$	$\pm 222,5$	$\pm 72,1$	$\pm 34,4$	$\pm 58,7$	$\pm 139,4$	$\pm 92,7$	$\pm 161,6$	$\pm 42,5$	$\pm 35$	$\pm 37,3$
<b>D0</b>	635,6	540,3	563,1	596,4	426,8	572,6	498,8	554,8	554,5	1495,8	1818,9	1508,8	304,9	424,7	394,1
	$\pm 85,2$	$\pm 43,4$	$\pm 92,7$	$\pm 159,7$	$\pm 77,1$	$\pm 197,4$	$\pm 61,9$	$\pm 34,8$	$\pm 75,85$	$\pm 94,1$	$\pm 82,2$	$\pm 161,8$	$\pm 27,5$	$\pm 25,9$	$\pm 57,3$

Fonte: (OCTAVIANO, 2021)

GE: gestações espécie-específicas (controle); GM: gestações de muare; GCL: gestações de clones equinos; D-6: 6 dias antes do parto; D-5: 5 dias antes do parto; D-4: 4 dias antes do parto; D-3: 3 dias antes do parto; D-2: 2 dias antes do parto; D-1: 1 dia antes do parto; D0: dia do parto.