

CONCENTRAÇÃO PROTEICA NOS FLUIDOS FETAIS COMO MÉTODO INDICADOR DA MATURIDADE RENAL DE FETOS CANINOS

Christiane da Silva Barreto¹
Nereu Carlos Prestes²
Fabiana Ferreira de Souza³
Roberta Valeriano dos Santos⁴
Priscilla Mitie Matayoshi⁴
Bruna De Vita⁵
Luciana da Silva Leal⁶

RESUMO

O rim fetal, embora imaturo durante seu período de formação contribui para a sobrevivência do concepto durante seu crescimento. A produção de urina depende de uma série de mecanismos renais, os quais são influenciados diretamente pelo volume e composição dos fluidos corpóreos do feto e pela disponibilidade de água e eletrólitos maternos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a maturidade renal pela identificação de proteínas de baixa massa molecular e alfa-fetoproteína por eletroforese em SDS-PAGE (12%). Foram obtidas 40 amostras de líquido amniótico e alantoideano de 16 cadelas gestantes pela cesariana. A densidade óptica integrada (IOD) da banda protéica de 66kDa, considerada como alfa-fetoproteínas, foi de 15,94 para o líquido amniótico e 13,3 para o alantoideano. Cinco bandas proteicas presentes em ambos os fluidos podem expressar a maturidade renal (32; 30; 28; 20 e 12). Baseado nas informações e nos dados estatísticos obtidos com o experimento pode-se afirmar que a concentração proteica nos fluidos amniótico e alantoideano é um indicador viável para avaliação da maturidade renal em fetos caninos ($p < 0,05$).

Palavras-chave: maturidade renal, fluidos fetais, proteínas, canino.

PROTEIN CONCENTRATION OF FETAL FLUIDS AS AN INDICATOR METHOD OF CANINE RENAL MATURITY

ABSTRACT

The fetal kidney, although immature during their development period, contributes to the fetal survival during maturation. The production of urine depends on several renal mechanisms, which are directly influenced by the volume and composition of the fetal body fluids and the availability of maternal water and electrolytes. The aim of this study was to evaluate renal maturity by identification of low molecular weight proteins and alpha-fetoprotein by electrophoresis in SDS-PAGE (12%). It was obtained 40 samples of amniotic and allantoic fluid of 16 pregnant bitches by cesarean section. The integrated optical density (IOD) of protein band with 66kDa, considered as alpha-fetoprotein, was 15.94 for the amniotic fluid

¹ Professora Assistente Doutora da Faculdade de Medicina (FEMA). Caxias - Maranhão.

² Professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, nereu@fmvz.unesp.br. Suporte financeiro: FAPESP.

³ Professora de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Universidade de Franca

⁴ Mestrandas do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu

⁵ Doutoranda do Departamento Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu

⁶ Professora da Área de Reprodução Animal da UNIPAR – Campus de Umuarama –PR
Protocolo Comissão de Ética FMVZ/UNESP - Botucatu: 30/2002.

and 13.3 for the allantoids fluid . Five protein bands present in the both fluids can express the renal maturity (32, 30, 28, 20 and 12). With the information and statistical data obtained in this experiment, it can be conclude that the protein concentration in amniotic and allantoids fluids is a viable indicator for evaluation of the canine renal maturity ($p < 0.05$).

Keywords: renal maturity, fetal fluids, proteins, canine.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FLUIDOS FETALES COMO MÉTODO INDICADOR DE LA MADUREZ RENAL EN PERROS

RESUMEN

El riñón fetal, aunque inmaduro durante su periodo de formación, contribuye a la supervivencia del feto durante su crecimiento. La producción de orina depende de una serie de mecanismos renales, que están directamente influenciados por el volumen y la composición de los fluidos corporales del feto y por la disponibilidad materna de agua y electrolitos. El objetivo de este estudio fue evaluar la madurez renal mediante la identificación de proteínas de bajo peso molecular y de alfa-fetoproteína utilizando electroforesis en SDS-PAGE (12%). Por medio de cesárea, fueron obtenidas 40 muestras de líquido amniótico y alantoideo de 16 perras gestantes. La densidad óptica integrada (IOD) de la banda de la proteína de 66kDa, considerada como la alfa-fetoproteína, fue 15,94 para el líquido amniótico y 13,3 para el alantoideo. Cinco bandas de proteínas presentes en ambos fluidos pueden expresar la madurez renal (32, 30, 28, 20 y 12). Con base en la información y en los datos estadísticos obtenidos con el experimento se puede afirmar que la concentración de proteínas en los fluidos amniótico y alantoideo es un indicador viable para la evaluación de la madurez renal en fetos caninos ($p < 0,05$).

Palabras clave: madurez renal, líquidos fetales, proteínas, perros.

INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, a avaliação dos fluidos fetais tem sido estudada nas espécies bovina (1), caprina (2), ovina (3, 4) e canina (5-7), bem como em espécies silvestres, *Kerodon rupestris* (8), na busca por informações sobre os componenste bioquímicos e a fisiologia da maturação fetal.

A determinação pré-natal da maturidade fetal é importante, principalmente, nos casos de gestação de alto risco, quando a idade gestacional não é conhecida, em casos de cesarianas, ou ainda, quando a gestação é mantida pela aplicação de progesterona exógena (9).

O rim fetal, embora imaturo durante seu período de formação, contribui de forma decisiva para a sobrevivência do conceito no final de seu crescimento. A produção de urina está subjugada a uma série de mecanismos renais, os quais são influenciados diretamente pelo volume e composição dos fluidos corpóreos do feto e pela disponibilidade de água e eletrólitos maternos (10).

A determinação de microglobulinas vesicais, é útil na avaliação da função renal do feto, sendo confirmado pela presença de microglobulinas no fluido amniótico (11). A coleta do material pode ser realizada no momento da cesariana (8) ou mesmo durante a gestação com auxílio de exame ultrassonográfico (12). As microglobulinas vesicais apresentam baixa massa molecular, variando de 10 a 30 kDa, sendo facilmente reabsorvidas no tubulo proximal. Com o avanço da gestação, as células do túbulo proximal aumentam a capacidade de absorção, o que favorece a transferência destas proteínas para o ambiente amniótico. Assim, a maturidade

renal pode ser definida pelo aumento da filtração glomerular e pela avaliação da maturidade das células tubulares mediante o transporte de diversas moléculas (13).

A alfa-fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína presente no sangue fetal, de massa molecular média de 66kDa, sintetizada pelo saco vitelino e, posteriormente, pelo trato gastrointestinal e fígado do feto, tanto em humanos quanto nos animais (14, 15). Alguns autores afirmam que a alfa-fetoproteína está altamente relacionada com a maturidade do conceito, visto que passa da urina fetal para o líquido amniótico (15-18).

Os valores fisiológicos da AFP estão relacionados com a metodologia utilizada para sua detecção, no entanto, sua função biológica específica ainda é desconhecida (15,18).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a maturidade renal pela mensuração da concentração de proteínas totais, determinação de proteínas de baixa massa molecular e alfa-fetoproteínas nos fluidos amnióticos e alantoideanos de cadelas, além de propor parâmetros fisiológicos que possam ser úteis na clínica obstétrica nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 40 amostras de 16 cadelas gestantes submetidas à cesariana no Setor de Obstetrícia de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP. A idade gestacional foi determinada pela avaliação ultrassonográfica⁵, sinais clássicos de início de parto e aparência dos fetos. A raça, peso e idade das cadelas não foram levadas em consideração visto que a unidade de estudo foram os fetos com os anexos embrionários.

Para a colheita das amostras, realizou-se primeiramente, a dissecação da membrana corioalantoideana e amniótica para identificação adequada dos fluidos. O material em duplicata foi armazenado em tubos plásticos de 1,5ml, previamente identificados. Antes de cada procedimento, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm, durante uma hora, à -4°C. Uma alíquota foi separada para avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro, enquanto as demais amostras foram armazenadas em freezer à -20°C para dosagem de proteínas totais e realização da eletroforese.

A concentração de proteínas totais das amostras de fluidos fetais foi obtida pela metodologia de Bradford modificado⁶. Neste método, as proteínas presentes reagem com o corante Coomassie azul brilhante e as variantes do azul encontradas são correlacionadas com as concentrações proteicas. O ponto de máxima absorção foi a 610 nm ou filtro laranja, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro colorimétrico⁷ e os resultados expressos em mg/dL.

A determinação das massas proteicas foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% acrescida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (10) e referendado para os líquidos fetais caninos por Barreto (5). Proteínas de massa molecular inferior a 40kDa foram consideradas indicativas de funcionalidade renal devido a falta de dados em cães, e as próximas de 66kDa foram consideradas como alfa-fetoproteína.

Durante o procedimento, foram aplicadas em cada gel, amostras dos líquidos amniótico e alantoideano e um marcador de baixa massa molecular⁸ 10 a 250kDa. As amostras com indícios de contaminação com mecônio ou sangue foram excluídas.

Para a confecção dos géis e corrida eletroforética utilizou-se duas placas de vidro, previamente limpas com álcool etílico a 96%, medindo 10x8cm, montadas em justaposição e separadas por espaçador de polietileno com 1,0mm de espessura.

⁵ Scanner 240 – Pie Medical

⁶ Micropote – DOLES reagentes

⁷ B582, Micronal, Brasil

⁸ Rainbow Molecular Weight Markers- Amersham Pharmacia Biotech

Após a montagem da cuba eletroforética⁹, o gel de separação foi preparado e vertido entre as placas de vidro. A polimerização do gel ocorreu entre 15 a 30 minutos. Durante este intervalo, as amostras adicionadas com 5mg/μL de proteína total dos líquidos amniótico e alantoideano, foram diluídas em tampão da amostra, na proporção de 1:4 e fervidas à ±100°C, durante 10 minutos.

Posteriormente, o gel de empilhamento a 5% foi preparado e vertido sobre o gel de separação. Um molde de polietileno, em forma de pente, foi acomodado sobre o gel de empilhamento para formar canaletas que permitiam a aplicação das amostras. Após a polimerização do gel, foi adicionado o tampão de corrida já diluído na proporção de 1:4 (tampão:água) e as placas foram colocadas na cuba de corrida de eletroforese. Finalmente, as amostras foram aplicadas às canaletas do gel, com exceção de uma canaleta específica, onde foi aplicado uma alíquota do marcador de massa molecular, com intuito de identificar e comparar as bandas proteicas.

A cuba foi ligada a uma fonte estabilizadora para Eletroforese¹⁰ com miliamperagem constante de 24mA (12mA/gel) e voltagem máxima de 244V, por um período médio de duas horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e corados, inicialmente, com corante Coomassie azul brilhante, para verificar a separação, e então descorados e corados novamente com nitrato de prata, para avaliação das bandas protéicas. As imagens dos géis foram obtidas por um capturador de imagens¹¹, e posteriormente, armazenadas na geladeira à 4°C, em vasilhas plásticas com água MilliQ.

A leitura da imagem digitalizada foi realizada no Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP, utilizando-se analisador de imagens com software¹² específico, que demonstra a massa protéica e a densidade óptica integrada (IOD) de cada banda

Os dados obtidos nos métodos propostos foram submetido à estatística descritiva (média e desvio padrão) e representados em forma de tabelas. As diferenças que apresentaram probabilidade de significância menor que 5% foram consideradas significativas para o teste-t. As análises foram executadas por meio do Proc Mixed, SAS versão 6.12. Na avaliação das densidades ópticas integradas e das massas das bandas protéicas foi efetivado cálculo de medidas descritivas (média e desvio padrão) com o auxílio do excel.

RESULTADOS

Os valores de média e desvio-padrão para proteínas totais encontradas no líquido amniótico (n=40) e alantoideano (n=40) de cadelas gestantes (n=16) foi de 22,29 mg/dl, ± 16,19 e 37,86mg/dl, ± 12,52, respectivamente. Os valores encontrados apresentaram diferença significativa (p<0,05).

As bandas proteicas presentes no gel de eletroforese, com massa molecular próxima a 66 kDa, apresentou grande variação nos valores máximos e mínimos para a IOD, como observado na Tabela 1. Além disso, constatou-se que em várias amostras de líquido amniótico e alantoideano, as bandas proteicas estavam ausentes.

Tabela 1. Valores médios, mínimos e máximos da Densidade Óptica Integrada (IOD) da banda protéica de massa próxima a 66kDa, presente no líquido amniótico (35/40) e alantoideano (27/40) de cadelas gestantes (n=16).

	Líquido Amniótico	Líquido Alantoideano
--	-------------------	----------------------

⁹ Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System - Amersham Pharmacia Biotech

¹⁰ EPS 300 Power Supply – Amersham Pharmacia Biotech

¹¹ HpScanjet 3200C

¹² Image Master VDS and Analysis Software – Amersham Pharmacia Biot

	(n=35)	(n=27)
Média	15,94	13,3
Valores Mínimos	1,15	0,48
Valores Máximos	95,95	60,25

As massas e a IOD das bandas das proteínas de baixa massa, presentes nos líquidos amniótico e alantoideano, obtidas pela técnica de eletroforese em SDS-PAGE (12%) estão descritas na Tabela 2 e demonstradas na Figura 1.

Tabela 2. Média da Densidade Óptica Integrada (I.O.D.) das bandas proteicas (kDa) das proteínas de baixa massa, observadas no gel de separação (12%) presentes nas amostras (n) de líquido amniótico e alantoideano de cadelas gestantes (n=16).

Bandas proteicas kDa	I.O.D.	
	Líquido Amniótico (n)	Líquido Alantoideano (n)
40	56,95 (16)	105,66 (4)
38	103,18 (13)	132,24 (12)
36	51,72 (1)	65,59 (12)
35	65,32 (2)	159,68 (3)
34	193,91 (34)	42,15 (15)
33	65,71 (11)	39,54 (15)
32	61,72 (26)	43,09 (29)
31	---	22,62 (5)
30	62,67 (33)	69,82 (32)
29	35,51 (19)	26,89 (8)
28	12,75 (28)	27,62 (26)
27	8,55 (8)	17,69 (2)
26	8,54 (5)	25,09 (28)
25	6,15 (4)	6,38 (4)
24	11,52 (26)	17,74 (12)
23	15,89 (2)	2,84 (3)
22	15,5 (32)	7,71 (14)
21	3,23 (1)	---
20	36,32 (26)	28,57 (24)
19	---	12,73 (5)
18	25,88 (19)	45,88 (11)
17	47,68 (13)	28,29 (1)
16	14,97 (1)	63,27 (23)
15	43,74 (15)	37,93 (1)
14	68,84 (11)	46,85 (21)
13	43,18 (24)	49,33 (1)
12	43,08 (38)	66,14 (26)
10	17,44 (34)	41,27 (16)
9	---	51,76 (6)
8	8,01 (19)	14,64 (14)

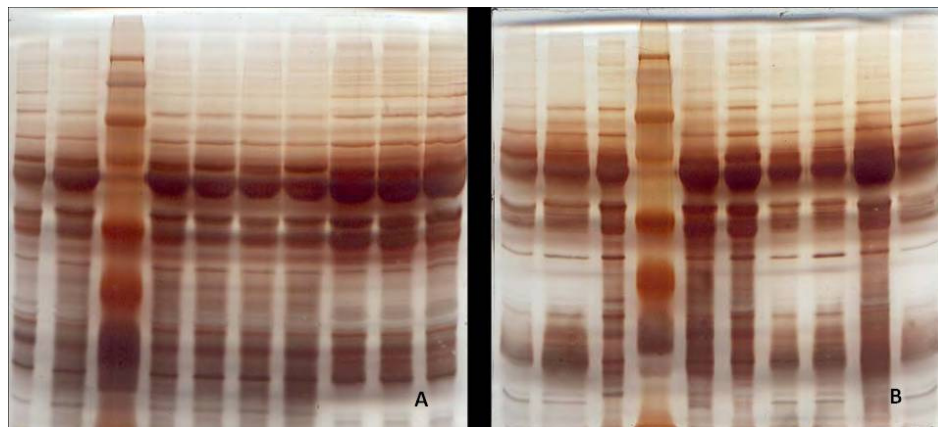


Figura 1. SDS-PAGE das amostras de líquido amniótico (A) e alantoideano (B) de cadelas gestantes (n=16). A massa molecular das bandas proteicas foi expressa em kDa com padrão de massa molecular (M.P.M.).

DISCUSSÃO

Foram coletadas um total de 52 amostras de fluidos fetais de 16 cadelas, porém algumas apresentaram volume insuficiente para as análises propostas. Das 52 amostras somente em 40 foram observadas paridade entre fluidos (amniótico:alantoideano) e volume adequado.

Dos elementos bioquímicos presentes nos fluidos fetais, as proteínas são encontradas em maior abundância e participam ativamente da formação celular e tecidual (17, 19). A concentração média de proteínas totais do líquido amniótico ($22,29 \pm 16,19$) e alantoideano ($37,86 \pm 12,52$) ($p < 0,05$) refletem a fisiologia diferenciada nos dois compartimentos fetais. Os valores observados nos fluidos convergem com os dados apresentados em trabalhos anteriormente realizados (6, 20).

Já a dosagem de alfa-fetoproteína (AFP) pode ser utilizada como meio diagnóstico para se detectar alterações no fechamento do tubo neural e na funcionalidade renal (21-23). Os valores propostos para a massa molecular das alfa-fetoproteínas em humanos e em cães é de 69kDa (18) e de 66kDa (14), respectivamente. Como as concentrações registradas estão altamente correlacionadas com a técnica de dosagem utilizada (15) e com a sensibilidade do teste (14) podem ocorrer divergências de dados.

Das 40 amostras analisadas, a banda proteica de 66kDa estava presente em 35 amostras de líquido amniótico e em 27 amostras de líquido alantoideano. Foi observada a presença desta proteína em pelo menos um dos líquidos de todos os fetos, o que contriuiu para reafirmar a utilidade das alfa-fetoproteínas na avaliação da maturidade fetal em cães.

A presença de proteínas de massa molecular baixa também são indicativas de funcionalidade renal (11). Foram detectadas 30 bandas proteicas com massa molecular abaixo de 40kDa, assim, para considerá-las como indicadoras da maturidade renal, foi avaliada a densidade óptica integrada das bandas que estavam presentes em pelo menos metade mais um das amostras, ou seja, 16 amostras.

Não foi realizada correlação das bandas entre os líquidos, visto que podem ser bandas proteicas de massa semelhante, mas eventualmente são bandas diferentes.

Das 30 bandas detectadas, três não estavam presentes no líquido amniótico (31; 19 e 9kDa) e uma no alantoideano (21kDa). A banda de massa molecular de 12kDa foi identificada em 38 das 40 amostras de líquido amniótico, sendo acompanhada das bandas 34 e 10kDa, que estavam presentes em 34 amostras. No líquido alantoideano a banda de massa 30kDa foi detectada em 32 das 40 amostras avaliadas, já a de 32kDa foi encontrada em 29 amostras.

Das 27 bandas detectadas no líquido amniótico, dez estavam presentes em 24 amostras, enquanto das 29 bandas encontradas no líquido alantoideano, oito estavam presentes em mais

de 20 amostras. A presença de bandas protéicas de mesma massa molecular, em várias amostras, contribui para esclarecer a atividade metabólica do concepto, a comunicação dos dois compartimentos com a circulação fetal e o processo de formação dos fluidos fetais.

Algumas bandas só foram identificadas em amostras específicas, como a de 36, 21 e 16kDa no líquido amniótico e a de 17 e 13kDa no alantoideano. Este fato pode ser atribuído às particularidades do feto, visto que foram em amostras de cinco fetos diferentes.

Cinco bandas protéicas presentes nos dois fluidos apresentam maior relação com a maturidade renal, visto que foram detectadas em mais de 20 amostras (32; 30; 28; 20 e 12).

Cada gel utilizado permitia a visibilização das bandas protéicas com diferentes contrastes, assim foi realizada uma comparação adequada, o que reduziu as possibilidades de erros na interpretação.

CONCLUSÃO

A banda de massa molecular de 66 kDa (alpha-fetoproteína) foi detectada em pelo menos um dos dois líquidos estudados em cada feto, podendo refletir a fisiologia fetal e cinco bandas protéicas presentes em ambos os fluidos podem espelhar a maturidade renal, pois foram detectadas em mais de 20 amostras (32; 30; 28; 20 e 12) demonstrando que a concentração proteica dos fluidos fetais é um indicador viável da maturidade renal de cães.

REFERÊNCIAS

1. Lindqvist A, Akerstrom B. Bovine alpha 1-microglobulin/bikunin. Isolation and characterization of liver cDNA and urinary alpha 1-microglobulin. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1:98-106.
2. Aidasani R, Pieterse ME, Vanderweyden GG, Taverne MAM. Some metabolic constituents of caprine foetal fluids and foetal serum. *J Anim Sci*. 1992;62:335-6.
3. Prestes NC, Chalhoub M, Lopes MD, Takahira RK. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. *Small Rumin Res*. 2001;39:277-81.
4. Nitsos I, Moss TJM, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *J Soc Gynecol Investig*. 2002;9:80-5.
5. Barreto CS. Avaliação bioquímica, citológica e do perfil eletroforético de proteínas no líquido amniótico e alantoideano de cadelas entre 30 a 40 dias da gestação e no momento do parto [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.
6. Veronesi MC, Battocchio M, Marinelli L, Faustini M, Kindahl H, Cairoli F. Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F2 α of the periparturient bitch. *J Vet Med*. 2002;49:264-8.
7. Olsson K, Bergstrom A, Kindahl H, Lagerstedt AS. Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F2 α metabolic during labour in the dog. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:281-7.

8. Zogno MA, Miglino MA, Oliveira MF. Análise bioquímica dos líquido fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004;41:228-35.
9. Lopate C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*. 2008;70:397-402.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 1970;277:680-5.
11. Lumbers ER, Smith FG, Stevens AD. Measurement of net transplacental transfer of fluid to the fetal sheep. *J Physiol*. 1985;364:289-99.
12. Çagdas A, Aydinli K, Irez T, Temizyrek K, Apak M. Evaluation of the fetal kidney maturation by assessment of amniotic fluid alpha-1 microglobulin levels. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;90:55-61.
13. Ferreira GJ, Carvalho AF, Branco E, Cabral R, Gregores GB, Fioretto ET, et al. Chorion biopsy in mongrel dogs. *Pesqui Vet Bras*. 2009;29:793-6.
14. Oliveira FR, Barros EG, Magalhães JA. Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:215-22.
15. Yamada T, Kakinoki M, Totsuka K, Ashida Y, Nishizono K, Tsuchiya R, et al. Purification of canine alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein values in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995;47:25-33.
16. Campana SG, Chávez JH, Hass P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39:215-8.
17. Belfort P, Orlandi OV. Placenta e anexos. In: *Medicina perinatal*. São Paulo: Manole; 1983. p.14-51.
18. Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serum and synovial fluids. In: *American society of clinical pathology*. Chicago: Third Ed.; 1993. p.130-58.
19. Maestri D, Sansaverino MTV, Cheinquer N, Correia MCM, Kessler RG, Azevedo Magalhães JA. Alfetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. *Rev Assoc Med Bras*. 1998;44:273-6.
20. Moore KL, Persaud TVN. Placenta e membranas fetais. In: *Embriologia clínica*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.233-88.
21. Branco ER, Ferreira GJBC, Samoto VY, Miglino MA. Aspectos bioquímicos de líquidos fetais de cães SRD (*Canis familiaris*-Linnaeus, 1758) [CD-ROM]. In: *Anais do 16o Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 2005, Goiânia*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 2005.
22. Gordon ED, Ferrá MC. Registro, incidencia y diagnóstico prenatal de las malformaciones congénitas mayores más severas. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 1999;15:403-8.

23. Newby D, Dalglish G, Luall F, Aitken DA. Alphafetoprotein and alphafetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term. *Placenta*. 2005;26:190-200.

Recebido em: 29/07/10

Aceito em: 03/05/12