

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Achados histopatológicos e morfometria das placentas de éguas Puro Sangue  
Inglês e sua relação aos dados obstétricos da égua**

**Fernanda Maria Pazinato**

Pelotas, 2015

**Fernanda Maria Pazinato**

**Achados histopatológicos e morfometria das placentas de éguas Puro Sangue Inglês e sua relação aos dados obstétricos da égua**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador (a): Cristina Gevehr Fernandes  
Coorientador: Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P348a Pazinato, Fernanda Maria

Achados histopatológicos e morfometria das placentas de éguas puro sangue inglês e sua relação aos dados obstétricos da égua / Fernanda Maria Pazinato ; Cristina Gevehr Fernandes, orientadora ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, coorientador. — Pelotas, 2015.

67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Placenta. 2. Equinos. 3. Histologia. 4. Morfometria. 5. Laminite crônica. I. Fernandes, Cristina Gevehr, orient. II. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Fernanda Maria Pazinato

Achados histopatológicos e morfometria das placentas de éguas Puro Sangue Inglês  
e sua relação aos dados obstétricos da égua

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 12/02/2015

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira  
Doutor em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna da Rosa Curcio  
Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. PhD. Rodrigo Costa Mattos  
PhD em Ciências Agrárias pela Tierärztliche Hochschule Hannover

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos alcançadas, oportunidades e conquistas, pelas pessoas especiais que colocou em meu caminho e pela sabedoria nas horas mais necessárias. Aos meus pais, Odilon e Juraci, por todo o amor e apoio dedicado. As minhas irmãs e avós, que mesmo distantes apoiaram e auxiliaram em minhas decisões, da maneira mais sabia possível. Muito obrigada a minha família pela oportunidade de seguir com esta caminhada.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Gevehr Fernandes, por ter aceitado o desafio da orientação, e por ter me dado a oportunidade e toda a base necessária para inserção na área da patologia, resultando na conclusão deste trabalho. Agradeço a dedicação que tiveste em inserir mais um profissional na sua área de trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, pelas oportunidades e orientação, desde o período da residência e co-orientação no período de mestrado. Agradeço não somente pelo auxílio na formação profissional, mas também por todos os conselhos e sabedoria passada como pessoa. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna da Rosa Curcio, pelo companheirismo e paciência em todo esse período, auxiliando sempre na construção deste trabalho e orientações desde a residência. Além disso, agradeço pela amizade construída.

As professoras, aos técnicos e aos colegas do LRD, por todo o apoio durante a inserção no mestrado e na área que estava adentrando, especialmente a Adriana e Leticia, que nunca dispensaram esforços para me auxiliar. Aos colegas do Clineq, minha segunda família, que não foram apenas colegas, mas sim grandes amigos, auxiliando nos momentos de dificuldade e decisões. Em especial a Lorena, Rubia, Cassiano, Tomás, Alice, Patrícia, Bruna e Laura por todo o companheirismo durante o mestrado e também no período de residência.

Aos criatórios e colegas de campo, que disponibilizaram os animais e cederam seu tempo para contribuição na realização deste estudo. Enfim, a todos aqueles que auxiliaram na construção de mais uma etapa, meu muito obrigada

## Resumo

PAZINATO, Fernanda Maria. **Achados histopatológicos e morfometria das placentas de éguas Puro Sangue Inglês e sua relação aos dados obstétricos da égua.** 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Foram realizados dois estudos, com o objetivo de relacionar os aspectos anatomopatológicos da placenta de éguas Puro Sangue Inglês, com os dados da égua e peso do potro. O primeiro estudo descreve os achados histopatológicos das placentas de éguas PSI saudáveis e sua relação com a macroscopia placentária e dados das éguas. Foram utilizadas 188 éguas, cujas placentas foram avaliadas macro e microscopicamente. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff (PAS). Os dados avaliados nas éguas foram idade, número de partos, tempo de gestação, tempo de eliminação da placenta, comprimento do cordão umbilical, peso da placenta, e apresentação de sinais clínicos de placentite na gestação avaliada. Na macroscopia 79 placentas não demonstraram alteração, 87 apresentaram artefatos e 22 tinham placentite. Na histologia, observou-se que em 30 placentas o epitélio coriônico apresentava mais vacúolos, os quais se coravam pelo PAS. As éguas com esse tipo de placenta eram mais velhas e com maior número de partos. Observou-se 40 casos de placentites, sendo 19 crônicas e 21 agudas. Em 19 casos verificou-se hipoplasia de microcotilédones. Em 93% dos casos, os achados macroscópicos foram consistentes com a histologia placentária. A presença de sinais clínicos foi condizente com a histologia de placentite, entretanto, 19,3% das éguas com placentite na histologia, não demonstraram sinais clínicos. No segundo estudo avaliou-se a morfometria vascular da placenta de éguas PSI com laminite crônica. Foram utilizadas 26 éguas, 13 com apresentação de laminite crônica na gestação avaliada, e 13 éguas saudáveis. A pressão arterial sistólica e frequência cardíaca foram obtidas de 10 éguas, de cada grupo. As placentas eram avaliadas macroscopicamente e coletados fragmentos para histopatologia e morfometria. Foram obtidas imagens digitalizadas de corpo uterino, corno gravídico e corno não gravídico, e as medidas realizadas através do software NIH ImageJ 1.48r. As medidas dos vasos foram diâmetro vascular total, diâmetro de luz vascular e espessura de parede vascular. As medidas dos microcotilédones foram área total de microcotilédones, área capilar de microcotilédones e diferença entre área total de microcotilédones e capilar. Foram considerados idade da égua, tempo de gestação, número de partos, peso da placenta e peso do potro. As éguas com laminite crônica demonstraram quadro de hipertensão, com menor tempo gestacional, peso da placenta e do potro. Na morfometria estas demonstraram menor luz vascular, maior espessamento de parede vascular e menor área capilar nos microcotilédones. A laminite cursa com quadro hipertensivo, sendo este possivelmente responsável por alterações morfométricas vasculares.

**Palavras-Chave:** placenta; equinos; histologia; morfometria; laminite crônica.

## Abstract

PAZINATO, Fernanda Maria. **Achados histopatológicos e morfometria das placentas de éguas Puro Sangue Inglês e sua relação aos dados obstétricos da égua.** 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Were made two studies, attempt to the relation between placental anatomopathologic and data from Thoroughbreds mares and foal weight. The first study aimed to describe the histopathological features of the placentas of healthy Thoroughbred mares at foaling and to evaluate their relationship with the gross placental and mare's data. The study was performed using 188 Thoroughbred mares, whose the placentas were grossly and histologic evaluated. The slides were stained using hematoxylin and eosin and periodic-acid-Schiff (PAS) reagents. The data from mares were age, number of parturition, gestational age, placental elimination time, umbilical-cord length and placental weight and signs of placentitis. In grossly evaluation were observed 79 placentas without alterations, 87 with artifactual findings and 22 placentitis. In histology were observed 30 placentas with intense cytoplasmic vacuolization of the epithelial areolar cells, that stained by PAS. These mares were older and larger parturition number. In 40 of the placentas, the histopathological changes consisted of placentitis, 19 these with chronic placentitis and 21 acute placentitis. Also observed 19 placentas with hypoplasia/atrophy from microcotyledones. In 93% of cases the placental grossly were consistently with histologic findings. The mares that demonstrate clinical sings of placentitis showed correspondent histologic findings, however in 19,3% of mares have placentitis in histology without presence of clinical sings. On second study the aim was evaluate the placental microcotyledonary and vascular morphometry, in Thoroughbreds mares with chronic laminitis. Twenty six mares divided in two groups were used, 13 these with chronic laminitis, and 13 mares healthy. Arterial systolic pressure and cardiac frequency were obtained in 30 days pre-foaling. The placentas were submit to grossly evaluation and taken samples to histopathological and morphometric study. Digital images analysis was made from placental uterine body, gravid horn and non gravid horn, and measures by software ImageJ 1.48r. Measures of allantoic surface vessels was total vessel diameter, lumen vessel diameter and wall vessel thickness. In microcotyledons the measures was total area from microcotyledons, capillary area from microcotyledons, difference capillary/total area from microcotyledons and relation between these areas. The age of mare, gestational age, number of parturition, placental weight and foal weight were considered. The mares with chronic laminitis showed hypertension, lower gestational period, placental and foal weight. These mares showed lower lumen vessel diameter, thickness of wall vessel e less capillary area from microcotyledons.

**Key-Words:** placenta; equine; histology; morphometry; chronic laminitis.



## Lista de Figuras

### Artigo 1

- Figura 1 A) Grossly evaluation of normal placenta, with velvet-like appearance of chorionic face. b) Normal placenta in histology, showed chorionic face with randomized distribution of microcotyledones. c) Microcotyledonary hypoplasia or atrophy, showed absent villi with necrosis of remaining microcotyledon. d) Suppurated material with discoloration and thickening on chorionic surface of cervical star and placental body, featuring placentitis. e) Suppurative inflammation on the microcotyledones, with a predominance of neutrophils, necrosis and edema in chorionic face. f) Mild to moderate inflammation of chorionic surface, with predominance of mononuclear infiltrate..... 30
- Figura 2 A) Chorionic epithelium with intense cytoplasmic vacuolization. B) PAS stained showed presence of mucopolysacharides inside of cytoplasmic vacuoles..... 31

### Artigo 2

- Figura 1 Imagem sequencial da morfometria vascular e de área microcotiledonária e área capilar. (A) Diâmetro vascular total, com o plug in "Straigth"; (B) diâmetro da luz vascular, com o plug in "Straigth"; (C) seleção pelo método "ColorThreshold" para obtenção da área total de microcotilédones (x20; área de

	campo total: 146.673 $\mu\text{m}^2$ ); (D) seleção pelo método “ColorThreshold” para obtenção da área capilar dos microcotilédones.....	50
Figura 2	A. Vasos da região alantoideana em corno gravídico das éguas do grupo controle. B. vasos da região alantoideana em corno gravídico das éguas do grupo laminite, demonstrando maior espessura de parede (aumento de 10x).....	54
Figura 3	A. Microcotilédones de corno gravídico das éguas do grupo controle. B. microcotilédones de corno gravídico das éguas do grupo laminite crônica, demonstrando região de fibrose no estroma dos vilos (seta) (aumento de 20x).....	54

## Lista de Tabelas

### Artigo 1

Table 1	Relation of placental grossly and histologic evaluation of Thoroughbred mares in term.....	32
Table 2	Placenta histologic evaluation in Thoroughbred mares and its relation with the obstetric data (age of mare, number of parturition, gestational age, placental elimination time, umbilical cord length, placental weight immediately after expulsion).....	33
Table 3	Clinical signs of placentitis and placental histologic evaluation.....	33

### Artigo 2

Tabela 1	Médias $\pm$ erro padrão da média de idade (anos), pressão arterial sistólica (mmHg), frequência cardíaca (bpm), do tempo de gestação (dias), número de partos peso da placenta (kg) e peso do potro (kg).....	52
Tabela 2	Médias $\pm$ erro padrão da média do diâmetro vascular total, diâmetro de luz vascular, espessura de parede vascular, área total de microcotilédones, área capilar dos microcotilédones e relação de área total/capilar dos microcotilédones na placenta de éguas PSI a termo.....	53

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CTUP	Combined thickness of the uterus and placenta
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
IV	Intravenous
LSD	Least-significant difference
mCal	Megacaloria
MHz	Mega Hertz
PAS	Ácido periódico de Schiff (do inglês periodic acid Schiff)
PSI	Puro Sangue Inglês
PO	Oral via
SE	Standard error

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2 Revisão de Literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Avaliação Macroscópica.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Avaliação Histológica.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Vascularização Placentária.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Morfometria Vascular da Placenta.....</b>	<b>19</b>
<b>3 Artigos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Artigo 1.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Artigo 2.....</b>	<b>45</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>62</b>
<b>Referências.....</b>	<b>63</b>

## 1 Introdução

A placenta, além de funcionar como um órgão de trocas metabólicas entre o feto e a mãe, é considerada um órgão endócrino transitório. É o único meio de comunicação entre mãe e feto e, por isso, alterações na placenta podem determinar aborto, parto prematuro ou nascimento de neonatos não viáveis (FOWDEN & FORHEAD, 1998, p. 468).

Perdas gestacionais tardias podem ser resultado de alteração fetal, doença materna ou disfunção placentária. Alterações que cursem com comprometimento na unidade uteroplacentária, como infecções e hipoxemia, vão reduzir o aporte de nutrientes e oxigênio para o feto (BUCCA, 2006; p. 750). Os efeitos dessas alterações no feto são dependentes da natureza, duração, severidade, e da idade gestacional da ocorrência da condição estressante. Assim, o comprometimento placentário pode levar a abortos, natimortos, potros prematuros, e com alteração incompatível com a vida, ou ainda nascimento de potros a termo sem nenhuma ou pouca alteração (GILES, et al. 1993b; BAIN, 2004).

Alterações na égua no pré-parto são facilmente identificadas, porém comprometimento fetal e disfunção placentária são mais difíceis, dessa forma a monitoração no terço final de gestação e a avaliação placentária no pós-parto tornam-se imprescindíveis para o reconhecimento de alterações que possam comprometer o neonato (TROEDSSON, 2007, p. 1).

A avaliação placentária no pós-parto pode ser útil para o reconhecimento de alterações não observadas durante a gestação, sendo que em neonatos de risco, esta torna-se imprescindível (SCHLAFER, 2004; LE BLANC, 2010).

O reconhecimento prévio de alterações que possam comprometer a gestação e o desenvolvimento do neonato após nascimento, bem como a detecção dos fatores de risco referentes às éguas gestantes, podem auxiliar os centros de criação de equinos, na melhoria da produção e redução de custos. Dessa forma, esse estudo tem como justificativa a necessidade de um entendimento mais acurado acerca da

importância das alterações placentárias, consideradas junto às características maternas, no prognóstico neonatal.

O objetivo do estudo é relacionar os aspectos anatomopatológicos da placenta de éguas Puro Sangue Inglês, com os dados obstétricos da égua e peso do potro.

Assim sendo, tem-se como hipótese que os achados anatomopatológicos estão inter-relacionados, e relacionados aos dados obstétricos e alterações sistêmicas da égua, podendo refletir no prognóstico de alterações neonatais.

## 2 Revisão de Literatura

A placenta é um órgão transitório, formado por tecidos maternos e fetais, com a função de transportar substâncias nutritivas do organismo materno para o feto, sendo responsável pela síntese, secreção e absorção de uma série de substâncias, incluindo hormônios, fatores de crescimento, enzimas, proteínas e carboidratos, todos essenciais ao desenvolvimento do feto (LEISER & KAUFMANN, 1994). A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adecídua (ABD-ELNAEIM, et al. 2006, p. 1108).

Histologicamente a placenta é formada por uma porção alantoideana e outra coriônica, ambas oriundas do mesoderma e a invasão vascular acompanha o mesoderma alantoideano (ALLEN, 2005a).

Alterações no desenvolvimento microcotiledonário, ou que cursem com destruição dos mesmos levam a comprometimento das trocas entre mãe e feto. Dentre estas alterações, quadros de placentite são os mais comumente encontrados no terço final de gestação (MACPHERSON, 2006, p. 763).

A placentite caracteriza-se por uma doença infecciosa, na qual vários agentes etiológicos estão envolvidos, sendo os mais comuns: *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Leptospira* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardioform actinomycete* e *Aspergillus* spp. (HONG, et al. 1993b, LE BLANC, 2010).

Segundo Le Blanc (2010) quadros infecciosos que cursam com inflamação da placenta, levam ao desprendimento da interface útero-placenta, com consequente redução da área de troca materno-fetal cursando com hipóxia no feto, além de distúrbios relacionados a produção hormonal para manutenção adequada da gestação. Além disso, o processo inflamatório cursa com liberação de diversos mediadores, incluindo a prostaglandina, o que gera redução da quiescência uterina, favorecendo quadros de abortos (LE BLANC, et al. 2002).



## 2.1 Avaliação macroscópica

A placenta é caracterizada por face coriônica de coloração vermelha a acastanhada com superfície de aspecto aveludado devido à presença dos microcotilédones, enquanto a face alantoideana apresenta coloração roxa a azulada, com vasos sanguíneos proeminentes (SCHLAFER, 2004; WHITWELL & JEFFCOTT, 1975).

A superfície coriônica pode ser considerada um reflexo do endométrio da égua, sendo que locais onde não há contato da placenta com o endométrio, seja por fibrose endometrial, ou compressão direta do feto sobre uma região vascular, podem resultar em áreas de avilosidades placentária (BUCCA, 2006; LAUGIER, et al. 2011).

O corno gravídico é maior e possui a parede mais espessa que o corno não gravídico. As extremidades de ambos os cornos apresentam-se mais edematosos, sendo do corno gravídico mais proeminente (MORRESEY, 2005, p. 242).

A região da estrela cervical é caracterizada por ausência de vilosidades devido contato direto com a mucosa cervical, sendo uma importante região de avaliação no pós-parto devido a quadros inflamatórios, como placentite ascendente (WHITWELL, 1988; LE BLANC, 2004).

O âmnion caracteriza-se por ser uma fina membrana, com presença de proeminentes vasos sanguíneos. O cordão umbilical é responsável o transporte de sangue oxigenado e nutrientes para o feto.

Como descrito por Wilsher, et al. (2011, p. 109), no equino o cordão umbilical compreende uma porção proximal amniótica, a qual está coberta pelo âmnion e está ligada ao feto através do umbigo, e outra porção alantóica coberta pelo alantoide e que está ligada ao alantocóron. A porção amniótica do cordão umbilical contém duas artérias, uma veia umbilical, o remanescente da veia vitelínica e o úraco.

A placentite é comum no terço final de gestação, sendo geralmente causada por infecções bacterianas ascendentes via cérvix. Macroscopicamente caracteriza-se por presença de áreas de ausência de coloração do córion, podendo apresentar conteúdo supurativo (RUSSELL & WILKINS, 2006, p. 162).

Alguns achados macroscópicos podem ser considerados artefatos, sendo que a presença destes não é indicativo de lesão placentária que comprometa a unidade materno-fetal. Alterações de coloração placentária podem aparecer devido autólise e

congestão passiva. Também, a presença de placas queratinizadas no âmnion ou no cordão umbilical podem ocorrer (SCHLAFER, 2004).

Edema placentário é um achado comum em quadros de alteração inflamatória na placenta, ou mesmo de comprometimento vascular, entretanto este pode estar presente após retenção placentária devido a estase sanguínea (MORRESEY, 2005; LAUGIER, et al. 2011).

Na rotina clínica, o peso placentário é utilizado para identificação de placentas anormais, já que frequentemente ele aumenta em quadros de placentites (SCHLAFFER, 2004, p. 149).

## **2.2 Avaliação histológica**

A superfície apical da face coriônica é recoberta por microvilos longos e finos, os quais estão interdigitados com o epitélio do endométrio materno. Os microvilos fetais são frequentemente arranjados em grupos, ocupando a região das criptas endometriais (SAMUEL, et al. 1976). Estes são responsáveis pelas trocas hemotróficas e gasosas. O epitélio da região areolar, como descrito por Samuel, et al. (1974, p. 443), é caracterizado por uma única camada de células colunares altas, justapostas, ocasionalmente apresentando grânulos de pigmento amarelo em seu citoplasma, sugestivo de hemossiderina ou melanina, bem como a presença de inclusões lipídicas características da nutrição histotrófica.

Já o epitélio alantoideano é constituído por uma camada única de células cuboidais, com núcleos arredondados centrais. A porção alantoideana da placenta é composta por tecido conjuntivo frouxo que apresenta diversos vasos sanguíneos, constituídos por arteríolas fetais, que se convergem para formação do cordão umbilical (LEISER & KAUFMANN, 1994; ABD-ELNAEIM, et al. 2003).

O desenvolvimento microcotiledonário já é visível a partir de 80 dias de gestação, porém a maior taxa de crescimento e ramificação acontece no terço final de gestação (MACDONALD, et al. 2000). Os microcotilédones ramificados apresentam-se distribuídos de forma aleatória entre as regiões areolares, as quais correspondem a abertura das glândulas endometriais (WILSHER & ALLEN, 2012).

As células trofoblásticas da placenta em desenvolvimento invadem o tecido conjuntivo endometrial na égua formando densos agregados, que são os cálices

endometriais. As células formadoras desses cálices são poliédricas grandes e podem ser binucleadas (GINTHER, 1998, p. 98).

Os cálices são glândulas endócrinas transitórias de origem trofoblástica e endometrial, que se desenvolvem entre os dias 35 e 60 de gestação e podem variar de milímetros a poucos centímetros de diâmetro e são responsáveis pela produção de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (ALLEN, 2005b, p. 209).

Diferenças histológicas podem ser observadas de acordo com cada região placentária, como regiões de avilositades na estrela cervical, devido contato com cérvix, e maior densidade microcotiledonária, com vilos mais longos e ramificados no corno não gravídico quando comparado ao corno gravídico e corpo uterino da placenta (SAMUEL, et al. 1974; MACDONALD, et al. 2000).

A avaliação histopatológica da placenta pode revelar alterações não demonstradas durante a gestação ou na avaliação macroscópica. Segundo Schlafer (2004) e Macpherson & Bailey (2008) alterações inflamatórias na placenta são facilmente identificadas na histologia, sendo quadros de placentite os mais comumente encontrados no terço final de gestação.

Segundo Hong, et al. (1993b, p. 57) a maior parte das placentites bacterianas, com exceção de *Leptospira* spp. e *Nocardioform actinomycete*, podem ser consideradas como agudas ou crônicas de acordo com a apresentação histopatológica. Quadros agudos caracterizam-se por predomínio de infiltrados difusos de neutrófilos nos espaços intervilos, com necrose dos microcotilédones, enquanto quadros crônicos apresentam infiltrados de células mononucleares, focal ou multifocal, nos espaços intervilos, estroma dos microcotilédones, córion e alantóide, podendo ter necrose de microcotilédones, hiperplasia adenomatosa do epitélio alantoideano e hiperplasia com ou sem metaplasia escamosa do epitélio coriônico.

Além de lesões características de placentite, a histologia pode auxiliar no diagnóstico de diversas alterações, as quais podem não ser visualizadas macroscopicamente, como hipoplasia de microcotilédones, hiperplasia cística e adenomatosa do epitélio alantoideano, hialinização de vasos alantoideanos, presença de tumores como teratocarcinomas placentários, entre outras (HONG, et al. 1993a; SHIVAPRASAD, et al. 1994; ALLISON, et al. 2004).

### 2.3 Vascularização placentária

A maturidade morfológica da placenta é caracterizada pelo desenvolvimento dos microcotilédones, que se infiltram no endométrio uterino. A troca de nutrientes, oxigênio e gás carbônico entre mãe e feto é crescente, sendo que para isso há o desenvolvimento constante da vascularização placentária durante a prenhez. Essas trocas fisiológicas materno-fetais, que possibilitam o crescimento fetal, ocorrem através de vias hematógenas. Assim, devem-se considerar todos os componentes presentes nas barreiras entre os capilares maternos e fetais (ABD-ELNAEIM, et al. 2006).

Durante a vascularização placentária podem ocorrer dois processos distintos: a vasculogênese, que é o desenvolvimento capilar a partir da diferenciação de células precursoras de origem mesenquimal, e a angiogênese, resultante do desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes (KAUFMANN, et al. 2004). O desenvolvimento vascular da placenta de éguas, assim como nas mulheres (CHARNOCK-JONES, et al. 2004), é bifásico, caracterizado pelo desenvolvimento das vilosidades coriônicas intercaladas por uma rede complexa de capilares na fase inicial da prenhez, que se transformam em capilares alongados e paralelos na segunda metade da gestação (ALLEN, et al. 2007).

Na placenta equina são considerados dois sistemas sanguíneos para realização das trocas, um de origem materna e outro de origem fetal, sugerindo-se um sistema de troca contracorrente (ABD-ELNAEIM, et al. 2003, p. 41).

Segundo Abd-Elnaeim, et al. (2006, p. 1104) na égua a troca gasosa e de metabólitos depende principalmente da vascularização placentária fetal e materna, e o volume depende do tamanho dos microcotilédones. Com relação a rede vascular da placenta, os vasos sanguíneos, na fase inicial de gestação, estão claramente separados da lâmina basal do trofoblasto, pelo tecido conjuntivo adjacente. Os vasos sanguíneos fetais na placenta são circundados por uma lâmina basal bem definida (SAMUEL, et al. 1976, p. 262).

Em espécies como equinos e suínos, em que não há erosão do endométrio pelo trofoblasto para manter a característica de placenta difusa e não-invasiva no alantocórion, é necessário o desenvolvimento de redes vasculares durante a gestação (ABD-ELNAEIM, et al. 2003, p. 41).

Além de diversas alterações que podem ocorrer na unidade útero-feto-placentária, alterações sistêmicas na égua podem também cursar com comprometimento gestacional. Em humanos, complicações na gestação, como hipertensão ou diabetes, são refletidos na placenta de diversas formas.

Em casos de hipertensão materna, particularmente na pré-eclâmpsia, ocorre vaso espasmo materno levando a redução do fluxo sanguíneo uteroplacentário (BEWLEY, 1991, p. 875).

Em equinos, a laminite geralmente cursa com quadros hipertensivos, sendo reportado alterações gestacionais, como abortos, natimortos, ou mesmo partos prematuros, em éguas apresentando laminite crônica (GARNER, et al. 1975; CLARKE, et al. 1982; JOHNSON, et al. 2009).

## **2.4 Morfometria Vascular da Placenta**

A área de processamento e análise de imagens é objeto de crescente interesse devido à grande aplicabilidade principalmente no aprimoramento de informações para interpretação humana e análise automática por computador de informações extraídas de uma imagem (DIAS, 2008, p. 30).

Os sistemas de imagens informatizados têm sido aplicados cada vez mais na medicina, devido facilidade e praticidade da avaliação de componentes teciduais e celulares através desses métodos. Diversas áreas da medicina humana com oftalmologia, neurociência, oncologia, obstetrícia, cardiologia e traumatologia tem aplicado técnicas morfométricas e estereolóicas através da utilização de imagens digitalizadas (FERREIRA, et al. 2011; OZERDEM, et al. 2013).

Além das avaliações macroscópicas e histológicas da placenta, os métodos morfométricos podem ser utilizados como ferramentas precisas para a obtenção de informações quantitativas tridimensionais acerca de estruturas microscópicas, baseadas nas observações feitas nas secções histológicas.

Dentre os softwares para análise de imagens, o ImageJ apresenta fácil aplicabilidade e caracteriza-se como um programa seguro, sendo utilizado principalmente na área de patologia, para auxiliar na mensuração de resultados em diferentes técnicas, como por exemplo em imunohistoquímica (HELMY & ABDEL-AZIM, 2012; OZERDEM, et al. 2013).

Na medicina veterinária, assim como na humana, diversas áreas também utilizam ferramentas de imagens e avaliações por métodos morfométricos. Em estudo de Allen, et al. (2002, p. 452) a avaliação morfológica da placenta equina demonstrou que a área microscópica de contato materno-fetal é afetada pelos genótipos maternos e fetais. O genótipo materno controla a densidade microcotiledonária, e o genótipo fetal pode ser responsável pela área placentária total.

Em outro estudo Wilsher e Allen (2003, p. 480) também demonstraram correlação positiva entre a densidade microcotiledonária e o peso do potro, além da relação entre idade da égua e densidade microcotiledonária, sendo que em éguas idosas, acima de dezesseis anos, a densidade microcotiledonária do córion foi menor.

### **3 Artigos**

#### **3.1 Artigo 1**

**Histological features of the placenta and their relation to the gross and obstetrical findings in Thoroughbred mares**  
**Fernanda Maria Pazinato, Bruna da Rosa Curcio, Cristina Gevehr Fernandes, Lorena Soares Feijó, Rubia Alves Schmith, Carlos Eduardo Wayne Nogueira**  
**Submetido a revista: Reproduction in Domestic Animals**

## **Histological features of the placenta and their relation to the gross and obstetrical findings in Thoroughbred mares**

Fernanda M Pazinato<sup>1</sup>, Bruna R Curcio<sup>1</sup>, Cristina G Fernandes<sup>2</sup>, Lorena S Feijó<sup>1</sup>, Rubia A Schmith<sup>1</sup>, Carlos E W Nogueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Clinics, Federal University of Pelotas, RS-Brazil

<sup>2</sup>Department of Animal Pathology, Federal University of Pelotas, RS-Brazil

### **Contents**

The placenta is responsible for fetal nutrition and maternofetal exchange, and thus, its development and function directly affect the growth and well-being of the fetus. The aim of this study was describe the histopathological features of the placentas of healthy Thoroughbred mares at foaling and to evaluate their relationship with the gross placental and obstetric data for these mares. This study was performed using 188 Thoroughbred mares, the parturition was assessed, the placentas were grossly evaluated and samples were collected immediately after expulsion. All of the samples were collected in formalin, processed routinely, and stained using hematoxylin and eosin for evaluation using optical microscopy; some of the placental samples were stained using periodic-acid-Schiff (PAS) reagents. Were considered age of mare and the



obstetrical data (number of parturition, gestational age, placental elimination time, umbilical-cord length and placental weight) and signs of placentitis were considered. Histological evaluation of the placentas revealed extensive cytoplasmic vacuolization of the epithelial areolar cells, presence of inflammatory infiltrates and hypoplasia/atrophy of the microcotyledons. Most of the gross placental findings were consistent with the histopathological results. In conclusion, vacuolization of the chorionic epithelium was characteristic of the placentas of older mares and those with a high parity number. The mares with a severe level of inflammatory infiltration of the placenta had a shorter gestational period.

## **Introduction**

The placenta is a transitory organ that originates from maternal and fetal tissues, the function of which is transporting nutrients from the mother to the fetus, as well as promoting metabolic changes and maintaining the pregnancy by performing endocrine functions for the production of hormones (LEISER & KAUFMANN, 1994). The equine placenta is a microcotyledonary diffuse epitheliochorial organ that is attached to the entire endometrium. The microcotyledons that cover almost the entire surface of the diffuse allantochorion allow gaseous and hemotrophic maternofetal exchange (ABD-ELNAEIM, 2006; WILSHER & ALLEN, 2012).

The development and function of the placenta directly affect the growth and well-being of the fetus in utero. Hence, deficits in either the structure or the function of the placenta will be reflected in fetal development (WILSHER, et al, 2005). Deviations in the appearance of the placenta from that considered normal provide information of importance to both the mare and the foal (MORRESEY, 2005). Neonatal risk identification should include a systematic evaluation of the placenta, using histopathology to recognize placental impairments that were not obvious during gestation (SCHLAFER, 2004; LE BLANC, et al 2004a).

We hypothesized that histologic findings are relation with gross evaluation of placenta and clinical characteristics of the mares. Older mares showed particularities in histopathological features. Degrees of placental inflammation were associated with different grossly and clinical outcomes of the mares.

The aims of the study were describe the histopathological features of placentas of healthy Thoroughbred mares at foaling and evaluate their relationship with the gross placental and obstetric data for these mares.

### **Materials and methods**

A prospective observational study of a population of Thoroughbred mares from a farm in Aceguá, Rio Grande do Sul, Brazil (31°51'55"S; 54°10'02"O) was performed. The study was performed using 188 mares from 2009 to 2013, with the approval of the Ethics Committee on Animal Experimentation of the UFPel under protocol number 5810. On the farm, all of the mares were maintained in a semi-extensive system, and received a balanced concentrated diet with 12% protein and 27.5 mCal of digestible energy. They were provided free access to water.

#### *Monitoring the mares*

The mares were observed daily during feeding for clinical signs of placentitis, like vulvar discharge and precocious udder development. Transrectal palpation and ultrasonic examination were performed monthly to assess the fetus and placenta. The combined thickness of the uterus and placenta (CTUP) was measured at the placenta-cervical junction (transrectally) using a 5-MHz linear transducer (SonoVet600, Medison Co.Ltd, Seul, KR), starting at the fifth month of pregnancy until delivery. The CTUP was considered normal when the values was <8mm in 271 to 300 days of gestation, <10mm in 301 to 330, and <12mm in more the 330 days of gestation, as describe by Renaudin et al (1997).

Mares with clinical signs of placentitis, like vulvar discharge and precocious udder development, ultrasonographic changes to placental separation and/or thickening of the CTUP were treated with trimethoprim sulfamethoxazole (25 mg/Kg IV, q 12 h; Trissulfim<sup>®</sup> - Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP-BR) and flunixin meglumine (1.1 mg/Kg IV, q 12 h; Banamine<sup>®</sup> - Schering Plough Saúde animal, São Paulo, SP-BR) for 10 days and altrenogest (0.088 mg/Kg, PO, q 24 h; Regumate<sup>®</sup> - Merck Animal Health Corporate headquarters, Summit, NJ-BR) until delivery.

#### *Managing parturition*

From thirty days prior to the date of delivery, the mares were maintained in paddocks near the maternity barn until the moment of delivery. After the chorioallantois ruptured, the mares were brought into the stable for assisted foaling. Immediately after their expulsion, the fetal membranes were weighed and were then placed in an “F” shape for gross evaluation. The two surfaces of the chorioallantois was examined for abnormalities of the color, areas devoid of microcotyledonary villi, thickened areas and presence of exudate on the chorionic surface. (SCHLAFER, 2004). Samples with 3x3cm dimension were obtained from nine points for each placenta, were these: the pregnant horn, the non-pregnant horn, the uterine bifurcation, the uterine body, three parts of the umbilical cord, and the cervical star area. Placentas with grossly detectable lesions had two samples collected, on lesion and transition area. Any other placental tissue with suspicious lesions was also sampled. All of the samples were fixed using formalin 10% prior to processing for histology. Histological sections (3- to 5- $\mu$ m thick) were mounted on glass slides and were stained using hematoxylin and eosin.

The slides were evaluated using optical microscopy, the chorion-allantois membrane was examined to integrity of chorionic and allantois epithelium, arrangement of microcotyledones, presence of alterations in all components of chorion-allantois membrane, as inflammatory infiltrates, edema, necrosis and hypoplasia/atrophy for microcotyledones.

Placentas with lesions were those with at least three altered points. The placentas showed vacuolization on the chorionic epithelium in histologic evaluation were also stained using periodic-acid-Schiff (PAS) reagents.

The following data were recovered for each mare: age of the mare, number of parturitions, gestational period, placental elimination time, umbilical-cord length and placental weight immediately after expulsion were recorded, as well as whether clinical signs of placentitis had occurred during pregnancy.

#### *Statistical analysis*

All of the data were evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. The response variables of the groups were reported as the mean values  $\pm$  SE. The independent variables was the histological results (no lesions, vacuolization, moderate infiltration, severe infiltration and hypoplasia/atrophy) and presence of clinical sings of placentitis. The dependent variables were placental grossly (no alterations, brownien-tan to grey appearance, loss or discoloration areas, devoid microcotyledons areas, edema, placentites) and data of mares (age, number of parturition, gestational age, placental elimination time, umbilical cord length and placental weight). Analysis of variance (ANOVA General) was performed to compare the histological results, gross findings and data of mares. To compare the gross variables, the clinical signs of placentitis and the histological results, Fisher's exact test was used. Comparison of the means was accomplished using the post-hoc *least-significant difference* (LSD) test. The statistical analysis was conducted using standard software. The level of significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## **Results**

In the gross placental evaluations (n=188), 79 placentas without abnormalities were found, which had a red chorion with a velvet-like surface. This appearance is due to the presence of microcotyledons. The allantoic surface had a bluish-colored smooth appearance and

contained prominent vessels (Figure 1a). In 87 cases, artifactual findings were observed, such as brownish-tan to grey colored tissue, colorless regions, irregular areas of discoloration, areas devoid of microcotyledonary villi and edema.

Furthermore, 22 of the placentas had suppurated or brown mucoid material on the chorionic surface, which are features of placentitis (Figure 1d), and sometimes displayed areas devoid of microcotyledonary villi, while discoloration and thickening were frequently observed. In three of these placentas, in addition to development of amnion, features of amnionitis were observed.

No gross lesions were observed in the umbilical cords. Only small, keratinized plaques (amniotic plaques) and edema were observed in the ruptured portion. The average length of the umbilical cords (n=188) was  $47.6 \pm 10.5$  cm, with minimal and maximal values of 30 cm and 84 cm, respectively.

Histopathological evaluation of 188 placentas was performed. No lesions were observed in 129 of these placentas, the chorionic surface of which showed cuboidal to columnar cells in the areolar regions, which corresponded to the endometrial cup opening. The cytoplasm of these epithelial cells was granular and eosinophilic, and the nuclei were round, vesicular, central or basal. Lipid and/or crystalline inclusions were occasionally observed. The villar clumps, which had a randomized distribution, formed the microcotyledons, which were sometimes branched (Figure 1b). The epithelium of the allantoic surface was composed of cuboidal, sometimes flattened, cells. Vascular congestion, with the presence of hemorrhagic and amorphous eosinophilic material, was observed between the microcotyledons.

In 30 of normal placentas (30/129) placentas, intense cytoplasmic vacuolization of the epithelial areolar cells was observed. The chorionic epithelium consisted of large cells containing vesiculated nuclei and frequently, finely granular cytoplasm. Cells with thin

projections at the periphery were also observed. Their cytoplasm was characterized by translucent material containing eosinophilic granules, compatible with histotrophic secretory (uterine milk) vesicles (Figure 2a). Their nuclei were small and rounded and were occasionally located in the periphery, and the vacuoles were PAS positive, suggestive of the presence of mucopolysaccharides (Figure 2b).

Histological differences between the placental regions were observed. In the cervical star, the chorionic epithelium showed foci of hyperplasia, with multiple layers of cuboidal to columnar cells in regions lacking microcotyledons. The allantoic surface was thick and displayed edema in the lamina propria. Finally, a thin single layer of flattened cuboidal cells, which were sometimes vacuolated, formed the allantoic epithelium.

The appearances of the gravid horn and the uterine body were similar to that of the chorionic surface. These regions had moderately dense microcotyledons, characterized by short villi, with broad areolar spaces. The bifurcation region had a higher density of microcotyledons and the vessels at the allantoic surface were larger in caliber and quantity. The extent of vascular congestion was higher in this region. The non-gravid horn showed a greater density of microcotyledons, which had a narrow base and long numerous villi. The areolar spaces in this region were smaller than those in other regions. The lamina propria of both the chorionic and allantoic surfaces was thin, with fewer and smaller vessels than those in the bifurcation region.

The amnion was a thin membrane of dense collagen that was lined with an epithelium consisting of cuboidal to low-columnar cells. In the umbilical cords, the presence of perivascular edema, with a mild level of infiltrating mononuclear cells at the site of rupture, was observed. However, no pathological features, such as torsions, thrombi or arteriosclerosis were observed.

In 40 (40/188) of the placentas, the histopathological changes consisted of inflammatory infiltrates. Nineteen (19/40) of these placentas exhibited an infiltrate consisting of mononuclear cells, with a prevalence of macrophages and lymphocytes, in lamina propria, chorionic epithelium and microcotyledons. The extent of infiltration was mild to moderate and ranged from multifocal to generally coalescent. The other 21 (21/40) placentas showed a severe extent of infiltration with suppurative inflammation throughout the chorioallantoic villi, with the preponderance of neutrophils, in the lamina propria, chorionic and allantoic epithelium, and among the trophoblasts of the microcotyledons (Figure 1e). Suppurative exudates ranged from multifocal to coalescent, and eosinophilic material consisting of cellular debris was present between the chorionic villi. Edema was occasionally observed in the lamina propria and the trophoblast of the microcotyledons. Only three of these placentas had lesions in the amnion, in which necrosis and the same types of inflammatory cells mentioned above were observed, which is characteristic of amnionitis.

In addition to inflammatory changes, nineteen (19/188) placentas exhibited microcotyledonary hypoplasia or atrophy, characterized by the presence of short villi, some of which had a narrowed base, or the lack of villi (Figure 1c). Necrotic microcotyledons were also present at the chorionic surface.

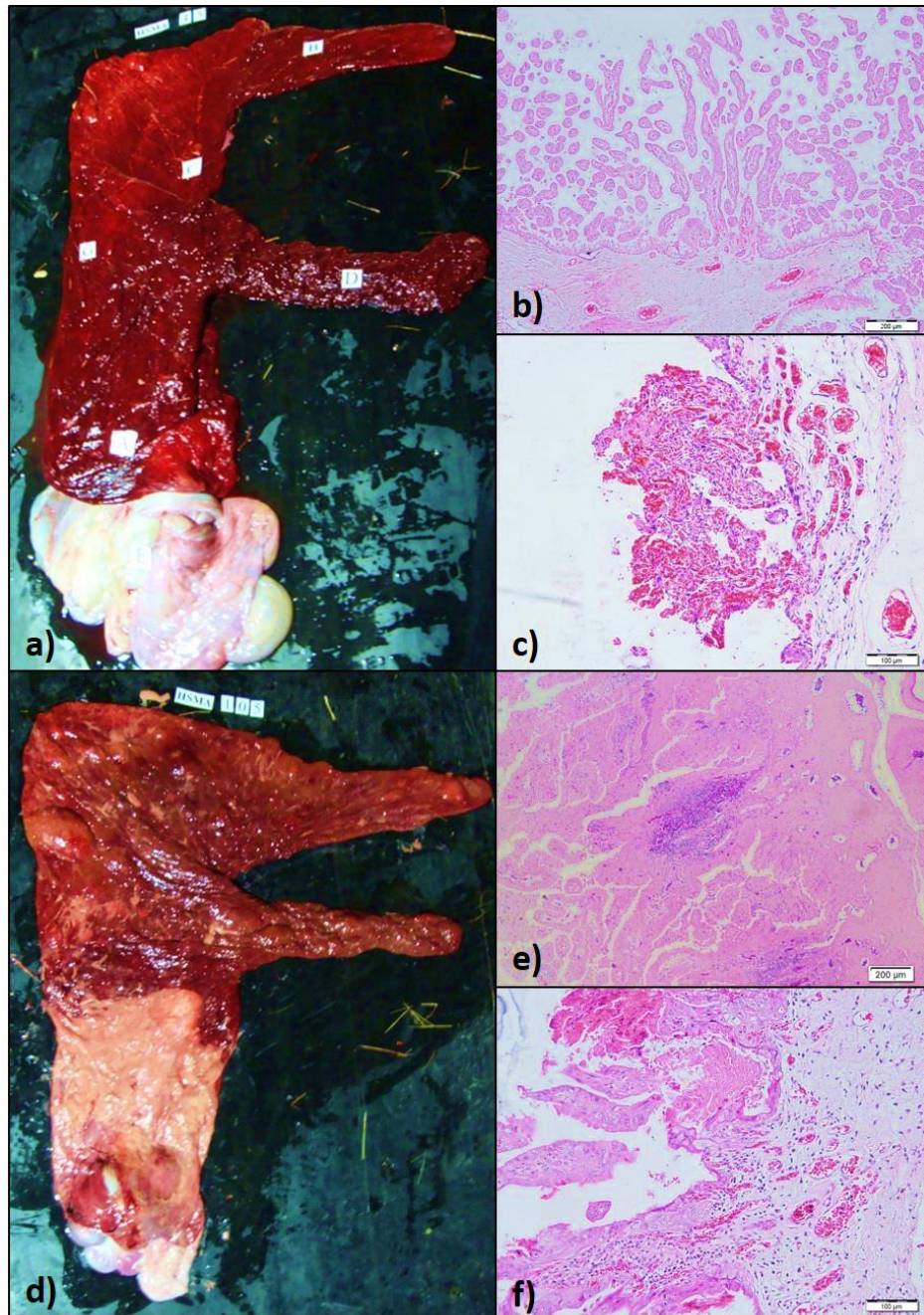


Fig. 1. A) Grossly evaluation of normal placenta, with velvet-like appearance of chorionic face. b) Normal placenta in histology, showed chorionic face with randomized distribution of microcotyledones. c) Microcotyledonary hypoplasia or atrophy, showed absent villi with necrosis of remaining microcotyledon. d) Suppurated material with discoloration and thickening on chorionic surface of cervical star and placental body, featuring placentitis. e) Suppurative inflammation on the microcotyledones, with a predominance of neutrophils,



necrosis and edema in chorionic face. f) Mild to moderate inflammation of chorionic surface, with predominance of mononuclear infiltrate.

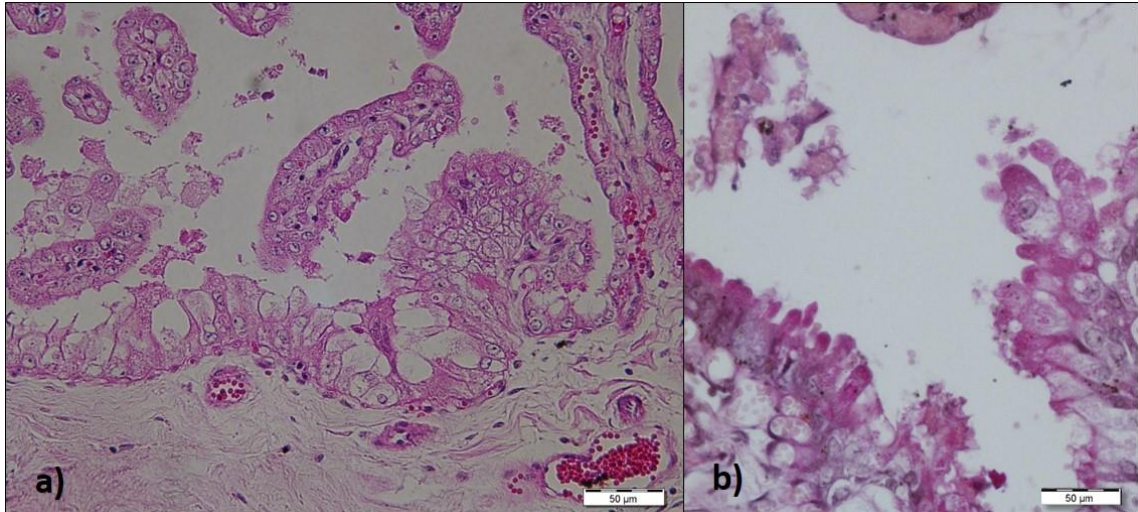


Fig. 2. A) Chorionic epithelium with intense cytoplasmic vacuolization. B) PAS stained showed presence of mucopolysaccharides inside of cytoplasmic vacuoles.

The relationship between the gross placental findings and the results of the histological evaluation are shown in Table 1.

**Table 1. Relation of placental grossly and histologic evaluation of Thoroughbred mares in term.**

<i>Gross Findings</i>	<i>Histology</i>	<i>NO LESIONS (n=129)</i>		<i>INFLAMMATORY INFILTRATE (n=40)</i>		<i>HYPOPLASIA/ ATROPHY (n=19)</i>
		<i>No Lesions (n=99)</i>	<i>Vacuolization (n=30)</i>	<i>Moderate Infiltration (n=19)</i>	<i>Severe Infiltration (n=21)</i>	
	<b>No alterations (n=79)</b>	57	12	0	2	8
	<b>Artifactual (n=87)</b>					
	<b>Brownien-tan to grey appearance (n=30)</b>	20	4	2	0	4
	<b>Loss or discoloration areas (n=9)</b>	3	2	3	0	1
	<b>Devoid microcotyledons areas (n=42)</b>	15	12	6	3	6
	<b>Edema (n=6)</b>	2	0	4	0	0
	<b>Placentitis (n=22)</b>	2	0	4	16	0

The mares with a vacuolated placental chorionic epithelium were older and had experienced a larger number of births than those in the other groups. The mares with inflammatory changes in their placentas, including both moderate and severe infiltration, had a shorter gestational period. The placentas of mares with hypoplasia/atrophy of the placenta had a lower weight. The relationship between the placental histological findings and the obstetrical data for the mares are in shown Table 2.

**Table 2. Placenta histologic evaluation in Thoroughbred mares and its relation with the obstetric data (age of mare, number of parturition, gestational age, placental elimination time, umbilical cord length, placental weight immediately after expulsion).**

<i>Obstetric Data</i>	<i>Histology</i>	<i>NO LESIONS (n=129)</i>		<i>INFLAMATORY INFILTRATE (n=40)</i>		<i>HYPOPLASIA/ ATROPHY (n=19)</i>
		<i>No Lesions (n=99)</i>	<i>Vacuolization (n=30)</i>	<i>Moderate Infiltration (n=19)</i>	<i>Severe Infiltration (n=21)</i>	
<b>Age</b>		9±0.36 <sup>b</sup>	13±0.85 <sup>a</sup>	9±0.71 <sup>b</sup>	10±0.94 <sup>b</sup>	9±1.05 <sup>b</sup>
<b>Number of Parturition</b>		4±0.29 <sup>a</sup>	6±0.76 <sup>b</sup>	3±0.55 <sup>a</sup>	4±0.74 <sup>ab</sup>	4±0.89 <sup>a</sup>
<b>Gestational age (days)</b>		346±0.92 <sup>a</sup>	349±1.99 <sup>a</sup>	338±3.13 <sup>b</sup>	335±3.17 <sup>b</sup>	347±2.93 <sup>a</sup>
<b>Placental elimination time (min)</b>		42±4.2 <sup>a</sup>	39±4.09 <sup>a</sup>	76±25 <sup>b</sup>	45±18.68 <sup>a</sup>	41±6.78 <sup>a</sup>
<b>Umbilical cord length (cm)</b>		48±1.18 <sup>a</sup>	48±1.91 <sup>ab</sup>	50±2.55 <sup>a</sup>	46±2.73 <sup>ab</sup>	42±1.87 <sup>b</sup>
<b>Placental weight (kg)</b>		6.9±0.13 <sup>a</sup>	6.8±0.22 <sup>a</sup>	6.6±0.34 <sup>a</sup>	7.0±0.42 <sup>a</sup>	6.2±0.28 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup> Values within a horizontal row with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ ).

The relationship between the clinical signs and the histopathological features of the placentas are shown in Table 3. The mares with a vacuolated placental chorionic epithelium ( $n=30$ ) did not show clinical signs during pregnancy.

**Table 3. Clinical signs of placentitis and placental histologic evaluation.**

	<b>Clinical signs of placentitis</b>		<b>Total (n=188)</b>
	<b>Yes (n=18)</b>	<b>No (n=170)</b>	
No lesions	3 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>	<b>99</b>
Vacuolization	0	30 <sup>a</sup>	<b>30</b>
Moderate Infiltrate	6 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	<b>19</b>
Severe Infiltrate	7 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	<b>21</b>
Hypoplasia/Atrophy	2 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	<b>19</b>
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>170</b>	<b>188</b>

<sup>ab</sup> Values within a vertical row with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ ).

Regarding the obstetrical data for the mares with clinical signs of placentitis, those that had placentas in which a severe level of infiltration was found on histological evaluation had a shorter gestational period ( $326.6\pm 6.5$  days;  $p<0.05$ ). The age, number of parturitions, umbilical-

cord length, placental elimination time and placental weight did not differ between the groups of mares with clinical signs of placentitis.

## **Discussion**

Examination of the postpartum equine placenta should be an integral part of identifying events that occurred during pregnancy that are often not clinically evident (COTRILL, et al. 1991; PIRRONE, et al. 2014). In 93% (176/188) of gross findings were consistent with placental histology. In this study, 90,9% (20/22) cases of placentitis was identified in gross evaluation, showing the presence of inflammatory infiltrates upon histology. As describe by Morresey (2005) grossly findings of placentitis, as discoloration and exudate on chorionic surface with thickness, can be easily identified during placental evaluation at delivery. Only, two placentas without grossly alterations showed severe infiltration. Similar results were reported by Mays et al (2002) in a study of ascending placentitis, which demonstrated that not all mares with placentitis exhibited premonitory clinical signs or gross placental pathology.

However, in two placentitis in grossly evaluation did not show histologic alterations. These findings are related to those of Schlafer (2004), who stated that some tissues exhibiting changes of questionable significance might require histopathology to differentiate artifacts from diagnostic lesions.

Histopathological evaluation of the placentas lacking lesions revealed a chorionic surface consisting of a tall columnar epithelium supported by a basal lamina containing moderate amounts of collagen, with slightly branched villi, which is characteristic of the diffuse epitheliochorial placenta of mares, and lipid/crystalline inclusions within the trophoblast cells, as describe by Samuel et al (1976) and Amoroso (1961).

The placentas with a vacuolated chorionic epithelium did not show gross alterations. Only artifactual findings were observed in them, consistent with the integrity of these placentas. The epithelium in the areolar regions, the sites of the endometrial gland openings, is responsible

for the absorption of the secretions of these glands. These regions can provide additional histotrophic nutrition to the conceptus throughout gestation, which plays an important role in fetal development and is essential during the last month of gestation, during which a higher rate of growth occurs (SAMUEL et al 1977; ALLEN, 2005).

Positive PAS staining of the vacuolated cells confirmed their absorption of mucopolysaccharides. The mares with these types of placentas were older ( $13\pm 0.85$  years) and a higher parturition number ( $6.46\pm 0.76$ ). These facts suggest that the mature mares had a more integrated utero-placental unit. However, no descriptions of the relationship between age and the vacuolization of the chorionic epithelium were found. The clinical importance of this finding in the histological evaluation of the term placentas were also not found in the literature.

Regarding the histological evaluation, the presence of a moderate level of infiltrates could be associated with chronic placentitis. As described by Hong et al. (1993a), chronic placentitis was characterized by the presence of one or a combination of the following lesions: necrosis of the chorionic villi, the presence of eosinophilic amorphous material on the chorion, and the presence of infiltrates of mononuclear inflammatory cells in the intervillous spaces, villous stroma, chorionic stroma, vascular layer, and allantois. Edema and infiltration of mononuclear cells, particularly macrophages, can appear when the placental elimination time is higher, and could be related with intra- and extra-uterine autolysis (SCHLAFER, 2004; RAPACZ, et al 2012).

In this study, the mares with a moderate level of infiltration of the placenta also had a higher placental elimination time ( $76.56\pm 25$  min). However, the presence of a moderate level of infiltration, predominantly of histiolympocytic cells, a low level of necrosis of the microcotyledons, with discrete tissue damage, and the absence of autolysis, which characterized the lesions exhibited by this group, indicated that they had chronic placentitis.

The mares in this group also had a shorter gestational period, although the duration was within the parameters for this breed, between 320 to 360 days (KOTERBA, 1990; SILVER, 1990). Le Blanc (2004b) and Troedsson et al (2007) reported that in some cases of chronic placentitis, gestation is prolonged and fetal maturation is accelerated due to the stimulation of inflammatory cytokines and prostaglandins, resulting in the foal being sufficiently mature to survive in the extra-uterine environment sooner than normal.

The lesions in the placentas with a severe level of infiltrates resembled those described by Hong et al. (1993a) as indicating acute placentitis, being focal or diffuse, with infiltration of neutrophils into the intervillous spaces or necrosis of the chorionic villi, sometimes was associated with bacteremia. A shorter gestational period was observed in these mares, compared with that of mares that had no histologically identified lesions of the placenta. Acute cases of infection involve inflammation and the consequent increase in the level of pro-inflammatory cytokines, such as prostaglandins, which mediate events that lead to premature labor, as observed by Le Blanc et al (2002) and Mays et al (2002) in experimental models.

The mares with hypoplasia/atrophy of the microcotyledons had a lower placental weight and umbilical-cord length when compared with placentas without alterations. The placental elimination time of these mares was similar to that of mares for which no lesions were found upon histological evaluation, and autolytic features were not observed in their placentas. In the study of Laugier et al (2011), the second most common cause of noninfectious abortion was placental villous hypoplasia, with 86 cases (17,3%). The lesions were characterized by extensive chorionic areas free of villi or with a diffuse marked paucity of villi, which limited the fetomaternal exchanges. In eight placentas with hypoplasia/atrophy of the microcotyledons did not show gross alterations, this fact can be suggested that the histologic lesions were artifactual.

No pathological features were observed in the umbilical cords, such as torsions or thrombosis. The average of umbilical-cord length was similar to that described by Wilsher and

Allen (2003),  $55 \pm 0.9$  cm, with the minimum and maximum lengths resembling those described by Whitweel and Jeffcott (1975), of 36 cm and 83 cm, respectively.

Umbilical cord lesions, mainly torsions, are often associated with noninfectious abortion and/or stillbirths (HONG, et al 1993b; SMITH, et al 2003; LAUGIER, et al., 2011), generally due to excessively long umbilical cords. Furthermore, Whitwell (1980) emphasized that many fetal deaths of unknown cause that occurred between 7 and 10 months of gestation were coincident with cords longer than 80 cm, which suggested that these abortions could be linked to undiagnosed abnormalities of the umbilical cord.

The incidence of mares with clinical signs of placentitis was 9,5%, similar to that found in the study of Hughes et al (2013), which showed that in 190 Thoroughbred mares, the incidence of those with the clinical signs of placentitis was 12,63%. All of the mares that exhibited clinical signs of placentitis during gestation were treated. This procedure may explain the occurrence of only moderate placental infiltration and the lack of lesions, allowing the pregnancies and delivery healthy foals. This fact corroborates the results of the studies of Murchie et al (2003) and Troedsson and Zent (2004), which suggested that treatment with a combination of antibiotics, anti-inflammatories and progesterone can positively affect the outcome of a pregnancy, allowing the delivery of healthy foals by mares that suffered placentitis.

Even the treatment was made, the most part of mares that showed clinical signs during gestation, demonstrate inflammatory infiltrate in histologic evaluation ( $n=13/18$ ). From these mares, inflammatory infiltrates were observed in 72,2% of the placentas upon histological evaluation, with 38,8% (7/18) of the placentas characterized by a severe level of infiltrates upon histology. The other 33,4% (6/18) demonstrated a moderate level of infiltrates, which is evidence of chronic placentitis. Currently the diagnosis of placentitis is based on clinical signs and transrectal ultrasonography of the placenta. Besides the ultrasonography of the placenta has

been shown to be a useful tool for the clinical diagnosis of ascending placentitis information on the sensitivity and specificity of the technique is limited, especially in early stages of placentitis that may not be detected in transrectal ultrasonography (TROEDSSON & ZENT, 2004; CANISSO, et al. 2015). However, 16,7% (3/18) of the mares with clinical signs of placentitis had no placental lesions upon histological evaluation.

The placentas of 19,3% (27/170) of the mares showed inflammatory lesions upon histology, although no clinical signs of placentitis, such as vaginal discharge or premature udder development, were observed during gestation. These results agree with those of Le Blanc (2010), who stated that unfortunately, many mares do not exhibit the classical signs of infection and thus, a diagnosis of placentitis is commonly missed.

In conclusion the gross evaluation of the postpartum placenta is an effective assessment method, the findings of which were consistent with the histological findings. In cases of the questionable significance of the gross appearance, samples should be sent for histological evaluation. Vacuolization of the chorionic epithelium was characteristic of the placentas of older mares and those with a high parity number. The mares with a severe level of inflammatory infiltration of the placenta had a shorter gestational period. The mares showed clinical signs of placentitis had consistent histologic findings. Great part of the mares with inflammatory infiltrates did not showed any clinical sign of placentitis. Thus, further studies are necessary to understand the clinical relevance of these lesions.

### **Acknowledgments**

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for providing financial support. We thank the members of the Haras Santa Maria de Araras (HSMA), who made the



animals available. We also thank Dr. Christopher Premanandan and Dr. Donald Schlafer for their scientific input.

### **Conflict of interest**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

### **References**

Abd-Elnaeim MMM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR, 2006: Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta* **27**, 1103–1113.

Allen WR, 2005: Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim. Reprod.* **2** (40), 209-223.

Amoroso EC, 1961: Placentation In: MARSHALL Physiology of Reproduction, 2 ed. Brown & Co. Boston: A. S. Parkers, **2**, (15) 127-311.

Canisso IF, Ball BA, Scoggin KE, Squires EL, Williams NM, Troedsson MH, 2015: Alpha-fetoprotein is present in the fetal fluids and is increased in plasma of mares with experimentally induced ascending placentites. *Anim. Reprod. Science*, **1**, 8 pages.

Cottrill CM, Jeffers-Lo J, Ousey JC, McGladdery AJ, Ricketts SW, Silver M and Rosedale PD, 1991: The placenta as a determinant of fetal well-being in normal and abnormal equine pregnancies. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **44**, 591-601.

Hong CB, Donahue JM, Giles RC, Petrites-Murphy MB Jr, Poonacha KB, Roberts AW, Smith BJ, Tramontin RR, Tuttle PA, Swerczek TW, 1993a: Etiology and Pathology of Equine Placentitis. *Journal Veterinary Diagnostic and Investigation* **5**, 55-63.

Hong CB, Donahue JM, Giles RC, Petrites-Murphy MB Jr, Poonacha KB, Roberts AW, Smith BJ, Tramontin RR, Tuttle PA, Swerczek TW, 1993b: Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *Journal Veterinary Diagnostic and Investigation* **5**, 55-63.

Hughes S, Stowe CJ, Troedsson MHT, Squires EL, 2013: The Athletic Performance of Thoroughbred Racehorses out of Mares Suspected of Placentitis during Gestation, *Journal of Equine Veterinary Science* **34** (4), 514-519.

Koterba AM, Prematurity. In: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC (Ed.), 1990: *Equine Clinical Neonatology*. Philadelphia, PA: Lea & Febiger. 54-70.

Laugier C, Foucher N, Sevin C, Leon A, Tapprest J, 2011: A 24-Year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). *Journal of Equine Veterinary Science* **31**, 116-123.

Leblanc MM, Giguere S, Brauer K, Paccamonti DL, Horohov DW, Lester GD, O'Donnell LJ, Sheerin BR, Pablo R, Rodgerson DH, 2002: Premature delivery in ascending placentitis is associated with increased expression of placental cytokines and allantoic fluid prostaglandins E-2 and F-2 alpha. *Theriogenology* **58**, 841-844.

Le Blanc MM, Macpherson M, Sheerin P, 2004a: Ascending Placentitis: What We Know About Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. In: 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, Colorado, (Ed.). Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

Le Blanc MM, 2004b: Ascending placentitis in the mare: what we learned from an experimental model. In: Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

Le Blanc MM, 2010: Ascending Placentitis in the Mare: An Update. *Reproduction in Domestic Animals* **45**, 28-34.

Leiser R, Kaufmann P, 1994: Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology* **102** (3), 122-134.

Mays MBC, Le Blanc MM, Paccamonti D, 2002: Route of fetal infection in a model of ascending placentitis. *Theriogenology* **58**, 791-792.

Morresey PT, 2005: Prenatal and Perinatal Indicators of Neonatal Viability. *Clinical Techniques in Equine Practice* **4**, 238-249.

Murchie TA, Macpherson ML, LeBlanc MM, Luznar S, Vickroy TW, 2003: A Microdialysis Model to Detect Drugs in the Allantoic Fluid of Pregnant Pony Mares. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* **49**, 118-119.

Pirrone A, Bianco C, Boldini S, Sarli G, Castagnetti C, 2014. Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from health and sick foals. *Theriogenology*. **3**, 1-7.

Rapacz A, Pazdzior K, Rás A, Rotkiewicz T, Janowski T, 2012. Retained Fetal Membranes in Heavy Draft Mares Associated with Histological Abnormalities. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**, 38-44.

Renaudin CD, Troedsson MHT, Gillis CL, King VL, Bodena A, 1997. Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by trans rectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. *Theriogenology*, **47** (2), 559-573.

Samuel CA, Allen WR, Steven HD, 1976: Studies on the equine placenta. II. Ultrastructure of the placental barrier. *J. Reprod. Fert.* **48**, 257-264.

Samuel CA, Allen WR, Steven DH, 1977: Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. *J. Reprod. Fertil.* **51** (2), 433-437.

Schlafer DH, 2004: Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: Methods and interpretation of findings. *Proceedings of the American Association on Equine Practitioners* **50**, 144-161.

Silver M, 1990: Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals. *Exp. Physiol.* **75** (3), 285–307.

Smith KC, Blunden AS, Whitwell KE, Dunn KA, Wales AD, 2003: A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Vet. J.* **35** (5), 496-501.

Troedsson, MHT, Zent WW, 2004: Clinical ultrasonographic evaluation of the equine placenta as a method to successfully identify and treat mares with placentitis, in Proceedings. Workshop on the Equine Placenta 66–67.

Troedsson MHT, 2007: High risk pregnant mare. *Acta Veterinaria Scandinavica* **49** (suppl 1) S9.

Wilsher S, Allen WR, 2003: The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet. J.* **35** (5), 476-483.

Wilsher S, Ousey J, Allen WR, 2005: Gross and histological observation on placentae from abnormal pregnancies. Proceedings of a Workshop on Comparative Placentology in Havemeyer Foundation Monograph Series **17**, 57-58.

Wilsher S and Allen WR, 2012: Factors influencing placental development and function in the mare. *Equine Veterinary Journal* **44**, Suppl. 41, 113-119.

Whitwell KE and Jeffcott LB, 1975: Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. *Res. Vet. Sci.* **19**, 44–55.

Whitwell KE., 1980: Investigations into fetal and neonatal losses in the horse. Vet. Clin. N. Am.: Large Anim. Pract. **2**, 313-331.

### 3.2 Artigo 2

**Morfometria vascular da placenta em éguas com laminite crônica  
Fernanda Maria Pazinato, Bruna da Rosa Curcio, Lorena Soares Feijó,  
Carlos Anselmo Dos Santos, Antônio Sérgio Varella Junior, Carlos Eduardo  
Wayne Nogueira, Cristina Gevehr Fernandes  
Irá ser submetido à revista: Placenta**

## Morfometria vascular da placenta em éguas com laminite crônica

Fernanda M Pazinato<sup>1</sup>, Bruna R Curcio<sup>1</sup>, Lorena S Feijó<sup>1</sup>, Carlos A Dos Santos<sup>1</sup>, Antônio S V Junior<sup>2</sup>, Carlos E W Nogueira<sup>1</sup>, Cristina G Fernandes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas, RS-Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas, RS-Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, RS-Brasil

### Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar a morfometria vascular dos microcotilédones, em placentas de éguas PSI com laminite crônica. Foram utilizadas 26 éguas da raça PSI, 13 éguas com laminite crônica na gestação avaliada, e 13 éguas saudáveis. Foram obtidas pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de 10 éguas de cada grupo, durante 30 dias pré-parto. Os partos foram assistidos e as placentas coletadas após expulsão para histopatologia. Para realização da morfometria de microcotilédones e vascular foram obtidas imagens digitalizadas das lâminas de corpo uterino, corno gravídico e corno não gravídico. Foram realizadas medidas dos vasos da região alantoideana, compreendendo diâmetro total vascular, diâmetro de luz vascular e espessura de parede vascular, e medidas da região terminal de microcotilédones, para medida de área total de microcotilédones, área capilar de microcotilédones, diferença entre área total de microcotilédones e capilar e relação entre área capilar e microcotiledonária. As medidas foram obtidas através do software NIH ImageJ 1.48r. Foram considerados idade da égua, tempo de gestação, número e partos, peso da placenta e peso do potro. As éguas com laminite crônica demonstraram quadro de hipertensão, com menor tempo gestacional, peso da placenta e do potro. Síndrome hipertensiva semelhante ao observado em mulheres foi encontrado nas éguas com laminite crônica, podendo ser responsável pelas alterações na morfometria vascular placentária destas éguas, como menor luz vascular, maior espessamento de parede vascular e menor área capilar nos microcotilédones. No entanto, mais estudos são necessários para entendimento do impacto dessa doença em éguas gestantes e seus neonatos.

**Palavras-chave:** placenta, éguas, morfometria, vascular, laminite crônica.



## **Introdução**

A placenta representa a principal comunicação da mãe com o feto, já que ela determina a disponibilidade e transporte de nutrientes e oxigênio [1]. Os fluxos sanguíneos uterino e umbilical, que representam a circulação para as porções materna e fetal da placenta, respectivamente, aumentam exponencialmente durante toda a gestação, essencialmente acompanhados pelo crescimento fetal, sendo as taxas de fluxo placentárias dependentes da vascularização da mesma [2,3,4].

Em humanos, complicações na gestação, como hipertensão ou diabetes, são refletidos na placenta de diversas formas. Em equinos são poucos os estudos voltados a alterações metabólicas e cardiovasculares na gestação, sendo a laminite uma das principais enfermidades sistêmicas relacionadas a esses quadros [5].

Em equinos, a laminite caracteriza-se como uma importante enfermidade relacionada a quadros hipertensivos. A doença determina mudanças na ativação adrenérgica e consequentemente alterações no endotélio vascular, causando aumento da resistência periférica, cursando com quadros hipertensivos durante o transcorrer da doença [6,7]. As características das placentas de éguas com laminite crônica durante a gestação, ainda não foram descritas.

Nós hipotetizamos que éguas com laminite podem apresentar alteração no fluxo sanguíneo útero-placentário, resultando em alterações na vascularização placentária, bem como lesões vasculares resultantes de hipertensão.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a morfometria vascular dos microcotilédones, em placentas de éguas PSI com laminite crônica.

## **Materiais e Métodos**

Foi realizado um estudo prospectivo caso controle, em uma população de éguas Puro Sangue Inglês, de três criatórios de Aceguá, Rio Grande do Sul, Brasil (31°51'55"S; 54°10'02"O). Foi utilizado um total de 26 éguas PSI múltiparas, com idades variando de 6 a 14 anos, no período de julho a novembro de 2011, após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, número 5810. Nos criatórios todas as éguas eram mantidas em sistema semi-extensivo, sendo fornecido concentrado balanceado com 12% de proteína e 27.5mCal de energia digestível. As éguas tinham acesso livre a água.

## 2.1 Seleção dos Casos

No presente estudo foram incluídas somente éguas com gestações saudáveis, sem histórico de alterações clínicas infecciosas. Além de apresentarem partos eutócicos, e os neonatos viáveis.

As éguas foram selecionadas em dois grupos conforme a presença/ausência de laminite crônica durante a gestação avaliada. Um grupo “**Laminite Crônica**”: composto de 13 éguas com de laminite crônica na gestação avaliada. O diagnóstico foi definido pela presença de claudicação > 2 na escala de 1 a 5, segundo Obel 1948 [9], apresentação de dor crônica, deformidades de casco, com linhas de crescimento evidentes, e rotação da terceira falange superior a cinco graus no exame radiográfico. Como grupo “**Controle**” foram utilizadas 13 éguas clinicamente saudáveis, sem sinais de laminite crônica, ou alterações clínicas, na gestação avaliada e em gestações passadas.

Foram obtidos dados clínicos de pressão arterial e frequência cardíaca em 10 éguas de cada grupo. O método para avaliação da pressão arterial foi indireto e não invasivo, sendo efetuada através do aparelho de esfigmomanômetro oscilométrico (Medeco easy control®). O aparelho foi posicionado na base da cauda e realizavam-se três aferições diárias no período de 30 dias pré-parto, perfazendo um total de 90 medições por égua. Com os dados das três aferições diárias calculava-se a média dos valores para obtenção da pressão arterial diária como descrito por Pereira em 1995 [10]. As frequências cardíacas foram aferidas por auscultação da área cardíaca utilizando estetoscópio. As aferições foram feitas diariamente por um período de 30 dias pré-parto.

## 2.2 Coleta das amostras

Os partos foram assistidos, sendo que as éguas ficavam em piquete e eram trazidas para a cocheira a partir do rompimento da bolsa alantoideana e exposição da membrana amniótica. As placentas foram coletadas e pesadas imediatamente após sua expulsão. Para avaliação macroscópica, as placentas foram dispostas em formato de “F”, como descrito por Schlafer em 2004 [11], sendo avaliadas ambas as faces placentárias, coriônica e alantoideana, em busca de alterações de coloração, presença de exsudato, espessamento, e ausência de vilosidades em face coriônica. Os potros foram pesados em balanças de plataforma convencionais logo após o nascimento. Foram obtidos dados de idade das éguas, tempo de gestação, peso da placenta imediatamente após expulsão e peso do potro após nascimento.

Para a avaliação histopatológica da placenta foram coletados fragmentos 3x3cm de nove pontos, sendo estes correspondentes a estrela cervical, corpo uterino, corno gravídico e não gravídico, bifurcação, âmnio e três pontos do cordão umbilical. Os fragmentos coletados foram armazenados em tubos Falcon de 50ml, com solução de formalina tamponada a 10% para fixação. Após, foram clivados e processados para inclusão em blocos de parafina, os quais foram submetidos a cortes de 3 a 5  $\mu\text{m}$  montados sobre lâminas histológicas, desparafinizados, hidratados e corados pelo método do hematoxilina-eosina. Para realização da histopatologia as lâminas foram avaliadas por microscopia de luz, sendo considerada qualquer alteração histológica, além de achados nos leitos vasculares.

Para realização da morfometria vascular, foram utilizadas as lâminas de corpo uterino, corno gravídico e corno não gravídico.

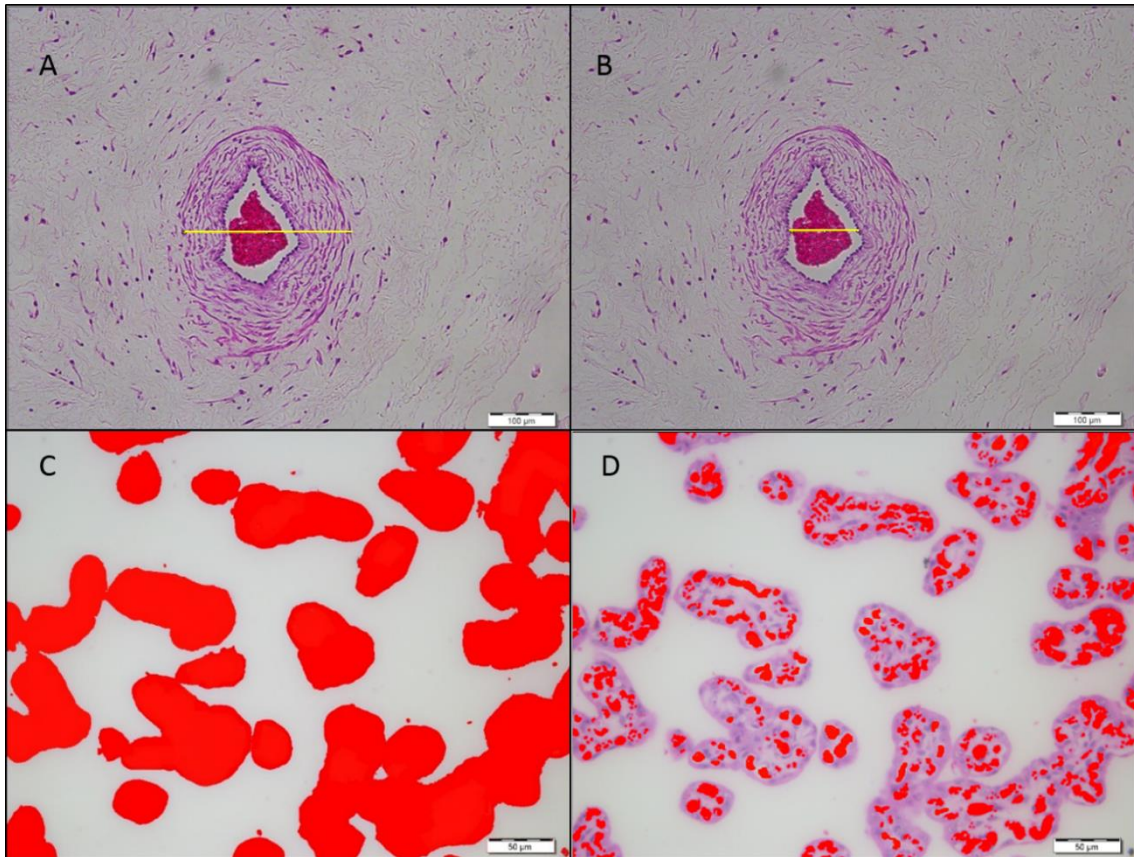
### 2.3 Morfometria vascular da placenta

Imagens digitalizadas das lamina de corpo uterino, corno gravídico e não gravídico foram realizadas através do microscópio Olympus BX51 (Olympus America, Center Valley, PA), com câmera digital de alta resolução Nikon SD (Nikon, USA, Melville, NY). Após captura das imagens estas foram avaliadas através do software de domínio público NIH ImageJ 1.48r, sendo as medições realizadas por método semi-automatizado.

Para realização das medidas de diâmetro vascular, foram feitas 30 imagens aleatórias, similar ao método utilizado por Wilsher & Allen em 2002 [12], sendo 10 correspondentes a região de corpo uterino, 10 correspondentes a corno gravídico e 10 correspondentes a corno não gravídico. Os vasos localizados na lamina própria na região de transição do alantocóron, onde é evidenciado a presença de arteríolas e vênulas terminais, foram avaliados. Inicialmente cada imagem teve o total de pixels calibrados para  $\mu\text{m}$ . A partir disso, foram realizadas medidas, através do plug-in "Straight" (Anexo 1), do diâmetro vascular total compreendendo luz e parede vascular (Figura 1A), diâmetro da luz (Figura 1B) e a diferença do diâmetro total pelo diâmetro da luz, resultando na espessura de parede vascular.

Para avaliação morfométrica dos capilares presentes nos microcotilédones, também foram realizadas 30 imagens dos microcotilédones de cada placenta, tendo como referência a região de epitélio coriônico, sendo 10 imagens correspondentes a corpo uterino, 10 correspondentes a corno gravídico e 10 correspondentes a corno não gravídico. As imagens capturadas foram avaliadas em RGB color, sendo o total de pixels de cada imagem calibrados para  $\mu\text{m}$ . A partir das imagens foi realizada quantificação do tecido microcotiledonário total

(Figura 1C) e capilar (Figura 1D) através da quantificação de pixels através do macro “ColorThreshold” (Anexo 1), no qual realizou-se o ajuste à amplitude de cores da escala RGB, que permitisse selecionar as áreas teciduais e isolar o fundo. A área de campo total das imagens foi de  $146.673 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 1. Imagem sequencial da morfometria vascular e de área microcotiledonária e área capilar. (A) Diâmetro vascular total, com o plug in “Straigth”; (B) diâmetro da luz vascular, com o plug in “Straigth”; (C) seleção pelo método “ColorThreshold” para obtenção da área total de microcotilédones (x20; área de campo total:  $146.673 \mu\text{m}^2$ ); (D) seleção pelo método “ColorThreshold” para obtenção da área capilar dos microcotilédones.**

#### 2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para as variáveis dependentes paramétricas, que apresentaram distribuição normal (idade, pressão arterial sistólica, frequência cardíaca, tempo de gestação, número de partos, peso da placenta, peso do potro, diâmetro vascular total, diâmetro de luz vascular, espessura de parede vascular,

área total de microcotilédones no corno gravídico, área capilar dos microcotilédones, diferença área total/área capilar no corpo uterino e corno gravídico) foi utilizada análise de variância One-Way AOV e comparação entre as médias utilizando teste *least-significant difference* (LSD). Para as variáveis não paramétricas (área total de microcotilédones no corpo uterino e corno não gravídico, diferença área total/área capilar no corno não gravídico) foi realizado método estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis. Foi considerado nível de significância quando  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Na avaliação macroscópica não foram encontradas alterações em nenhuma das placentas, em ambos os grupos. Na histologia não foram observadas alterações nas placentas do grupo controle (n=13), sendo todas as placentas consideradas saudáveis. Já nas éguas do grupo de laminite (n=13), 30,7% (4/13) das placentas apresentaram fibrose dos microcotilédones, com proliferação de tecido conjuntivo com arranjos por vezes circulares, sendo que em uma delas a fibrose estendia-se pela lamina própria da face coriônica. O leito vascular apresentou-se aparentemente normal, sem alterações de espessamento da parede vascular sugestivas de aterosose ou arteriosclerose, ou presença de infartos, coágulos em capilares dos vilos, espessamento de parede dos vasos sanguíneos placentários e hialinização dos mesmos.

As éguas do grupo laminite apresentaram maior pressão arterial sistólica e frequência cardíaca, e menores valores de tempo de gestação, peso da placenta e do potro (Tabela 1).

**Tabela 1. Médias  $\pm$  erro padrão da média de idade (anos), pressão arterial sistólica (mmHg), frequência cardíaca (bpm), do tempo de gestação (dias), número de partos, peso da placenta (kg) e peso do potro (kg).**

<b>Dados éguas</b>	<b>Grupo Controle (n=13)</b>	<b>Grupo Laminite (n=13)</b>
<b>Idade (anos)</b>	7.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	10.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3
<b>Pressão arterial sistólica (mmHg)*</b>	98.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	116 <sup>b</sup> $\pm$ 6.7
<b>Frequência cardíaca (bpm)*</b>	44 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5	52 <sup>b</sup> $\pm$ 4
<b>Tempo de gestação (dias)</b>	344 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	335 <sup>b</sup> $\pm$ 2.9
<b>Número de partos</b>	3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.6	4 <sup>a</sup> $\pm$ 0.6
<b>Peso da placenta (kg)</b>	6.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.3	5.8 <sup>b</sup> $\pm$ 0.3
<b>Peso do potro (kg)</b>	56.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	51 <sup>b</sup> $\pm$ 1.1

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas linhas representam diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

\*Esses dados foram avaliados em 10 éguas de cada grupo.

Com relação as medidas de morfometria vascular, não houve diferença no diâmetro vascular total entre os dois grupos, porem as éguas do grupo laminite crônica apresentaram menor luz vascular e parede vascular mais espessa (Figura 2). A área total de microcotilédones foi semelhante em ambos os grupos. Foi observada diferença em relação a área capilar dos microcotilédones, sendo que as éguas do grupo laminite apresentaram menor área capilar em corpo uterino e corno gravídico (Figura 3). Também foi observada maior diferença entre área total e capilar no corpo uterino das éguas com laminite crônica (Tabela 2).

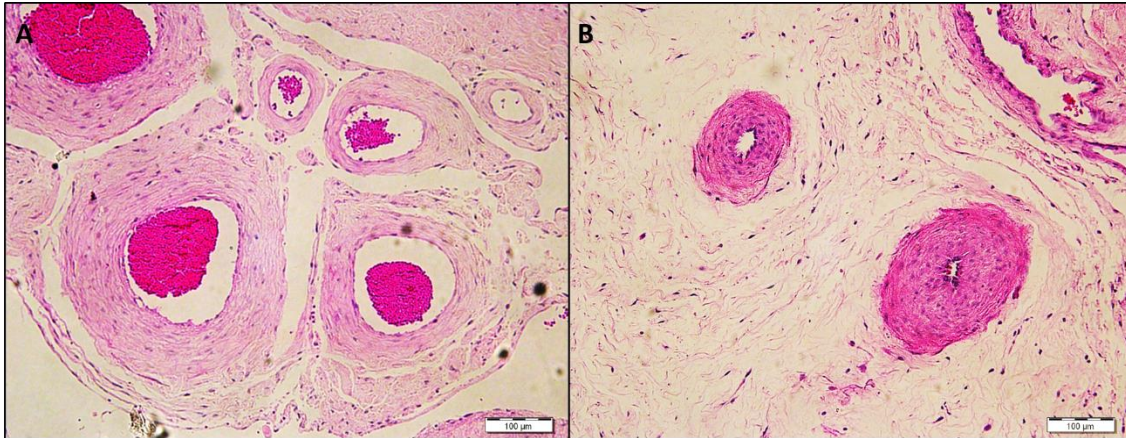
**Tabela 2. Médias  $\pm$  erro padrão da média do diâmetro vascular total, diâmetro de luz vascular, espessura de parede vascular, área total de microcotilédones, área capilar dos microcotilédones e relação de área total/capilar dos microcotilédones na placenta de éguas PSI a termo.**

	Grupo Controle (n=13)			Grupo Laminite (n=13)		
	Corpo Uterino	Corno Gravídico	Corno não Gravídico	Corpo Uterino	Corno Gravídico	Corno não Gravídico
<b>Diâmetro vascular total (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	226 <sup>aX</sup> $\pm$ 10.6	210 <sup>aX</sup> $\pm$ 8.8	100 <sup>aY</sup> $\pm$ 2.5	207 <sup>aX</sup> $\pm$ 9.2	229 <sup>aY</sup> $\pm$ 8.3	102 <sup>aZ</sup> $\pm$ 2.6
<b>Diâmetro luz vascular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	60 <sup>aX</sup> $\pm$ 4.3	59 <sup>aX</sup> $\pm$ 2.7	57 <sup>aX</sup> $\pm$ 2.2	45 <sup>bX</sup> $\pm$ 2.8	50 <sup>bX</sup> $\pm$ 2.8	59 <sup>aY</sup> $\pm$ 2.4
<b>Espessura de parede vascular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	165 <sup>aX</sup> $\pm$ 8.9	150 <sup>aX</sup> $\pm$ 8.3	43 <sup>aY</sup> $\pm$ 2.3	161 <sup>aX</sup> $\pm$ 8.4	179 <sup>bX</sup> $\pm$ 7.5	43 <sup>aY</sup> $\pm$ 2.2
<b>Área total dos microcotilédones (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	45897 <sup>aX</sup> $\pm$ 1172.2	45065 <sup>aX</sup> $\pm$ 1276.8	51556 <sup>aY</sup> $\pm$ 1380.5	43656 <sup>aX</sup> $\pm$ 1354	42263 <sup>aX</sup> $\pm$ 1374.4	51662 <sup>aY</sup> $\pm$ 1370.1
<b>Área capilar dos microcotilédones (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	11535 <sup>aX</sup> $\pm$ 394.5	11216 <sup>aX</sup> $\pm$ 371.3	14635 <sup>aY</sup> $\pm$ 556	8957.4 <sup>bX</sup> $\pm$ 433	9539.7 <sup>bX</sup> $\pm$ 447	14429 <sup>aY</sup> $\pm$ 633.6
<b>Diferença área total/área capilar (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	34362 <sup>aXY</sup> $\pm$ 992.7	33849 <sup>aX</sup> $\pm$ 1059.2	36921 <sup>aY</sup> $\pm$ 1046.5	34699 <sup>aX</sup> $\pm$ 1301.4	32723 <sup>aX</sup> $\pm$ 1283.8	37233 <sup>aX</sup> $\pm$ 1038.7
<b>Relação área total/capilar dos microcotilédones (%)</b>	25.13	24.88	28.36	20.51	22.57	27.92

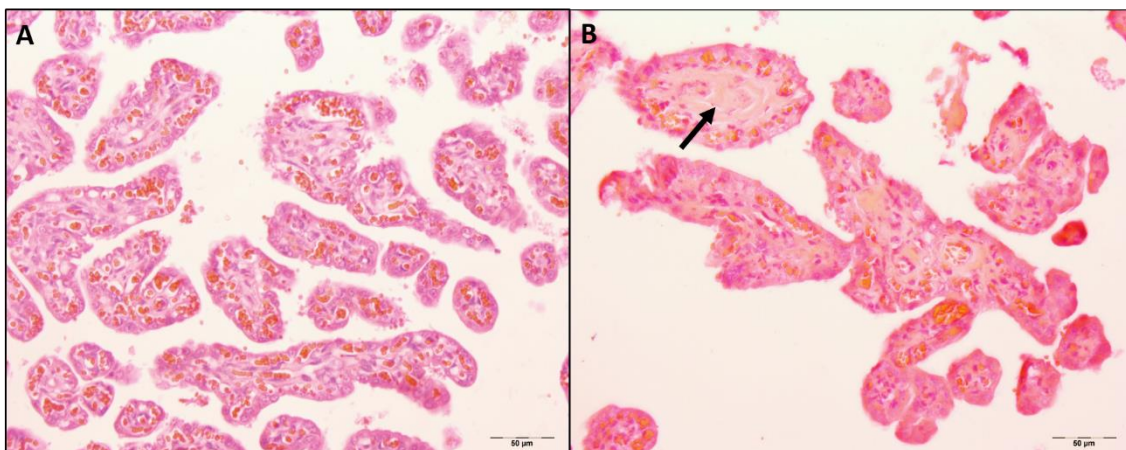
<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes nas linhas demonstram diferença estatística entre os grupos, relacionando os pontos de coleta (nível de 5%).

<sup>X,Y,Z</sup> Letras maiúsculas diferentes nas linhas demonstram diferença estatística entre os pontos de coleta no mesmo grupo (em nível de 5%).





**Figura 2. A. Vasos da região alantoideana em corno gravídico das éguas do grupo controle. B. vasos da região alantoideana em corno gravídico das éguas do grupo laminite, demonstrando maior espessura de parede (aumento de 10x).**



**Figura 3. A. Microcotilédones de corno gravídico das éguas do grupo controle. B. microcotilédones de corno gravídico das éguas do grupo laminite crônica, demonstrando região de fibrose no estroma dos vilos (seta) (aumento de 20x).**

## Discussão

As éguas do grupo laminite crônica demonstraram pressão arterial sistólica e frequência cardíaca elevadas em comparação as éguas controles, demonstrando quadro de hipertensão nas éguas com laminite crônica. Já é descrito que casos de laminite cursam com síndromes hipertensivas e hipertrofia ventricular esquerda [6,13].

Também foram observados menores tempo gestacional, peso placentário e peso do potro, nas éguas do grupo laminite crônica, quando comparadas as éguas do grupo controle. O quadro hipertensivo na égua pode resultar em redução do aporte nutricional ao feto, levando a



estresse fetal com liberação de cortisol e conseqüentemente desencadeamento precoce do parto. A redução do aporte nutricional pode levar a placentas mais leves e nascimento de neonatos menores. Rossdale em 2004 [14] descreve que doenças maternas sistêmicas podem levar a redução no desenvolvimento fetal por redução do aporte gasoso e nutricional, semelhante ao relatado em humanos com síndromes hipertensivas durante a gestação. A restrição de crescimento intrauterino em humanos é caracterizada por alteração dos fluxos sanguíneos uterino e umbilical, levando a redução da absorção de nutrientes, hipóxia fetal, hipoglicemia e alterações no crescimento dos órgãos [15,16].

Além disso, as éguas do grupo laminite crônica apresentaram fibrose na região dos microcotilédones. Como a placenta representa a interface materno-fetal, lesões de fibrose podem caracterizar resposta frente a alterações endometriais [17]. Quadros de hipertensão cursam com redução do aporte sanguíneo e conseqüente hipóxia do órgão afetado, sendo que em casos crônicos por estimulação do fator de hipóxia tecidual ocorre fibrose, já reportada em casos de síndromes hipertensivas em mulheres, diabetes mellitus e restrição de crescimento uterino [18,19,20]. Em outro estudo com síndromes hipertensivas em humanos, Ártico et al em 2009 [21], obtiveram menor peso e volume placentário, maior percentual de coágulos, aterosclerose e infartos macro e microscópicos nas placentas de mulheres hipertensas durante gestação.

As éguas do grupo laminite crônica apresentaram menor diâmetro de luz vascular, nos pontos de corpo uterino e corno gravídico. Redução de luz vascular é reportado em humanos, em quadros de hipertensão gestacional, onde ocorre disfunção endotelial e maior incidência de quadros de aterosclerose e arteriosclerose [22,23]. Porém, alterações histológicas sugestivas de aterosclerose e arteriosclerose, não foram observadas nas placentas das éguas do grupo laminite.

Em relação a espessura de parede vascular, foi observado que as éguas com laminite crônica apresentaram maior espessura somente no corno gravídico. Em equinos o corno gravídico representa a maior interface de trocas materno-fetais na placenta [11], dessa forma, devido a maior atividade neste ponto, a resposta frente a injúria materna pode ser agravada.

Na comparação entre os diâmetros vasculares total e de luz, em ambos os grupos foi observado que o corno não gravídico apresentou vasos menores e mais finos. Já é relatado que o corno não gravídico apresenta-se mais fino e com vilos longos e mais ramificados, quando comparado a outras regiões placentárias [24,11].

A área total de microcotilédones não apresentou diferença entre os grupos. Este fato pode sugerir que apesar de menor peso placentário, ocorreu adequado desenvolvimento microcotiledonário, visto que este é fator ligado ao genótipo fetal como descrito por Wilsher &

Allen em 2002 [12]. A área total de microcotilédones no corpo uterino e corno gravídico foi semelhante ao descrito por Bianco et al em 2014 [8].

Quando avaliada a área total de microcotilédones entre os pontos placentários, foi observada maior área total de microcotilédones no corno não gravídico, em todas as éguas de ambos os grupos. Corroborando com estudo de Whitwell & Jeffcott em 1975 [25] e de Macdonald et al em 2000 [26] onde descrevem maior densidade microcotiledonária no corno não gravídico. Na avaliação da área total de microcotilédones em placentas de potros saudáveis e doentes, foi observada maior ramificação e complexidade dos microcotilédones no corno não gravídico, o que poderia representar uma tentativa de aumentar a área de troca entre os compartimentos materno e fetal [8].

A área capilar presente nos microcotilédones foi menor nas éguas com laminite crônica nos pontos de corpo uterino e corno gravídico, ambas regiões que representam a maior parte das trocas metabólicas e gasosas materno-fetais. Durante a gestação a troca de nutrientes entre mãe e feto é crescente, sendo que a mesma quase dobra no terço final da gestação. Na espécie equina, esta troca é dependente da vascularização materna e fetal, enquanto que o volume depende particularmente do tamanho dos microcotilédones [27]. Também foi observada menor relação entre a área capilar e total de microcotilédones em corpo uterino e corno gravídico nas éguas com laminite crônica. No entanto, não foram encontradas maiores descrições desta relação na placenta de éguas.

Dessa forma, a manutenção da área microcotiledonária pode auxiliar a compensar menor área capilar nas éguas do grupo laminite crônica, sendo a fibrose uma resposta frente a hipóxia. Estudos em outros órgãos de fetos submetidos a hipóxia, como pulmão e rim, demonstraram resposta semelhante, com fibrose tecidual, reduzindo a área capilar em relação aos fibrócitos [28,29].

Em diversos estudos com situações de doença materna em humanos, como anemia e pré-eclâmpsia, foi observado que a placenta consegue compensar perdas de vilosidades para manutenção da capacidade de difusão no órgão, através por exemplo de redução da espessura dos vilos [30].

## **Conclusão**

Éguas com laminite crônica apresentam menor tempo gestacional, peso placentário e peso do potro. Foi observada síndrome hipertensivas nas éguas com laminite crônica, sendo esta possivelmente responsável pelas alterações na morfometria vascular destas éguas, como espessamento de vasos placentários, e redução de área capilar dos microcotilédones, reduzindo área capilar necessária às trocas gasosas materno-fetais, provavelmente devido ao quadro de hipertensão materna. Entretanto, mais estudos compreendendo a morfometria placentária, bem como a abordagem do endométrio de éguas com laminite, são necessários para compreensão dos problemas gestacionais no terço final dessas éguas.

## **Agradecimentos**

Agradecemos as instituições de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS. Ao Laboratório Regional de Diagnóstico pelo auxílio ao processamento do material para realização da histopatologia, e ao Laboratório de Histomorfometria da FURG pela disponibilidade da execução da etapa de digitalização das imagens.

## **Referências Bibliográficas**

- [1] Jansson T, Powell TL. 2006. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? A review. *Placenta*, 2006;27:91-97.
  
- [2] Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci*, 1995;73:1839–1851.
  
- [3] Magness RR. Maternal cardiovascular and other physiological responses to the endocrinology of pregnancy. In: Bazer FW, editor. *The Endocrinology of Pregnancy*. Totowa, NJ: Humana Press, 1998: 507–539.
  
- [4] Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*, 2004;25:103–113.

- [5] Johnson PJ, Messer NT, Seshu IV, Ganjam K, Wiedmeyer CE. Pregnancy-Associated Laminitis in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2009;29(1):42-46.
- [6] Garner HE, Hahn AW, Salem C, Coffman JR, Hutcheson DP, Johnson JH. Cardiac output, left ventricular ejection rate, plasma volume, and heart rate changes in equine laminitis-hypertension. *Am J Vet Res*, 1977;38(6):725-9.
- [7] Clarke LL, Garner HE, Hatfield D. Plasma volume, electrolyte, and endocrine changes during onset of laminitis hypertension in horses. *Am J Vet Res*, 1982;43(9):1551-5.
- [8] Bianco C, Pirrone A, Boldini S, Sarli G, Castagnetti C. Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from healthy and sick foals. *Theriogenology*, 2014;3:1-7.
- [9] Obel N. *Studies on the histopathology of acute laminitis*. Stockholm: Veterinary Stockholm, 1984;1-50.
- [10] Pereira M.G. *Epidemiologia: teoria e prática*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995;583p.
- [11] Schlafer DH. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: Methods and interpretation of findings. *Proceedings of the American Association on Equine Practitioners*, 2004;50:144-161.
- [12] Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey j, Rossdale PD, Fowden AL. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*, 2002;123:445-453.
- [13] Rugh KS, Garner HS, Sprouse RF, Hatfield DG. Left ventricular hypertrophy in chronically hypertensive ponies. *Lab Anim Sci*, 1987;37(3):335-8.
- [14] Rossdale PD. The maladjusted foal: Influences of intrauterine growth retardation and birth trauma. *Proc Am Assoc Equine Pract*, 2004;50:75-126.

- [15] Pardi G, Cetin I, Marconi AM, Lanfranchi A, Bozzetti P, Ferrazzi E, Buscaglia M, Battaglia FC. Diagnostic value of blood sampling in fetuses with growth retardation. *N Engl J Med*, 1993;328:692–696
- [16] Majumdar S, Dasgupta H, Bhattacharya K, Bhattacharya A. A study of placenta in normal and hypertensive pregnancies. *J Anat Soc India*, 2005;54(2):1-9.
- [17] Bucca S. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2006;22(3):749-761.
- [18] Macara L, Kingdom JCP, Kaufmann P, Kohlen G, Hair J, More IAR, Lyall F, Greer IA. Structural Analysis of Placental Terminal Villi from Growth-restricted Pregnancies with Abnormal Umbilical Artery Doppler Waveforms. *Placenta*, 1996;17(1):37-48.
- [19] Ducray JF, Naicker T, Moodley J. Pilot study of comparative placental morphometry in pre-eclamptic and normotensive pregnancies suggests possible maladaptations of the fetal component of the placenta. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproduction Biology*, 2011;156(1):29-34.
- [20] Jirkovská M, Kucera T, Kaláb J, Jadrníček M, Niedobová V, Janáček J, Kubínová L, Moravcová M, Zizka Z, Krejčí V. The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus. *Placenta*, 2012;33:343-351.
- [21] Artico LG, Madi JM, Godoy AEG, Coelho CP, Rombaldi JL, Artico GR. Alterações histopatológicas em placentas humanas relacionadas às síndromes hipertensivas. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2009;31(1):10-16.
- [22] Naicker T, Khedun SM, Moodley J, Pijnenborg R. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003;82:722-729.
- [23] Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G, 2006. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. [Nutr Metab Cardiovasc Dis](#), 2006;16(3):222-233.

- [24] Cottrill CM, Jeffers-Lo J, Ousey JC, McGladdery AJ, Ricketts SW, Silver M, Rossdale PD. The placenta as a determinant of fetal wellbeing in normal and abnormal pregnancies *Journal of Reproduction and Fertility*, 1991; Suppl.44:591–601
- [25] Whitwell KE and Jeffcott LB. Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. *Res Vet Sci*, 1975;19:44–55.
- [26] Macdonald AA, Chavatte P, Fowden AL. Scanning Electro Microscopy of the Microcotyledonary Placenta of the Horse (*Equus caballus*) in the Latter Half of Gestation. *Placenta*, 2000;21:565-574.
- [27] Abd-Elnaeim MM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*, 2006;27:1103–13.
- [28] Hutter D, Kingdom J, Jaeggi E. Causes and Mechanisms of Intrauterine Hypoxia and Its Impact on the Fetal Cardiovascular System: A Review. *International Journal of Pediatrics*, Article ID 401323, 2010; 9 pages, open in: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/401323>
- [29] Norman JT and Fine LG. Chronic hypoxia as a mechanism for progressive renal fibrosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2007;4(1):29-36.
- [30] Mayhew TM. Patterns of villous and intervillous space growth in human placentas from normal and abnormal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996;68(1-2):75-82.

## ANEXO 1

### **Morfometria vascular:**

Set scale: (“Know distance” - 100 $\mu$ m) global

Run: (“Straigth”)

Run: (“Analyze”)

Run: (“Measure”) – line distance

### **Morfometria áreas de microcotilédones e capilar:**

Set scale: (“Know distance” - 50 $\mu$ m/146.52 pixels) global

Run: (“Image”)

Run: (“Adjust”)

Run: (“ColorThreshold”) - in//selected

Run: (“Analyze”)

Run: (“Set Mearuments...”) – area – none decimal

Run: (“Measure”)

#### **4 Considerações Finais**

Os achados anatomopatológicos estão relacionados a características obstétricas das éguas, bem como a alterações sistêmicas destas. Eles demonstram lesões que podem comprometer o feto e acarretar o nascimento de neonatos de risco.

Os achados macroscópicos da placenta no pós-parto imediato estão relacionados à histologia. Dessa forma, a avaliação macroscópica deve ser considerada, entretanto algumas destas alterações podem gerar dúvida, sendo a histologia necessária para o reconhecimento e impacto destas lesões.

A idade da égua tem relação com diferentes achados histológicos na placenta. Em éguas mais velhas o epitélio coriônico apresenta-se mais vacuolizado, sendo este um achado casual, sem impacto negativo sobre o feto.

Éguas com alterações inflamatórias na placenta apresentam menor tempo gestacional. Grande parte das éguas que demonstram sinais clínicos de placentite durante a gestação apresentam lesões histológicas compatíveis. Entretanto, alguns animais não mostram sinais prévios durante a gestação, sendo a avaliação anatomopatológica necessária para adequado prognóstico neonatal.

A laminite crônica durante a gestação está associada a quadros hipertensivos, levando a gestações mais curtas e menores pesos de placenta e de potro. Provavelmente a hipertensão nas éguas com laminite crônica, foi o fator determinante das alterações na morfometria placentária. Contudo mais estudos são necessários para compreensão do processo de hipertensão gestacional ao qual as éguas com laminite crônica estão submetidas.



## Referências

ABD-ELNAEIM, M. M. M.; LEISER, R.; ALLEN, W. R. Structural and haematological aspects of the equine placenta in mid-pregnancy. **Havemeyer Found. Monogr. Ser.**, v.10, p. 39-42. 2003.

ABD-ELNAEIM M. M. M.; LEISER, R.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta**, v. 27, p. 1103–1113, 2006.

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**. v. 121, p. 513-527. 2005a.

ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. **Animal Reproduction Science**. v. 2, n. 4, p. 209-223, 2005b.

ALLEN, W.R.; GOWER, S.; WILSHER, S. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-I and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 516-526, 2007.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **Reproduction**. v. 123, p. 445-453, 2002.

ALLISON, N.; MOELLER, R. B. Jr.; DUNCAN, R. Placental teratocarcinoma in a mare with possible metastasis to the foal. **J Vet Diagn Invest**. v. 16, n. 2, p. 160-163, 2004

BAIN, F. T. Management of the foal from the mare with placentitis: A clinician's approach. **Proceedings Annu Am Assoc Equine Pract Conv**, p. 1419-1204, 2004.

BEWLEY, S.; COOPER, D.; CAMPBELL, S. Doppler investigation of utero-placental blood flow resistance in the second trimester. A screening study for pre-eclampsia and intra-uterine growth retardation. **B J Obst and Gynaecol**. v. 98, p. 871-879, 1991.

BUCCA, S. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. **Vet Clin Equine**.v. 22, p. 749-761, 2006.

CAMPOS, Daniela Barreiros. **Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura**. 2005. 193f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. **Placenta**, v. 25, p. 103-113, 2004.

CLARKE, L. L.; GARNER, H. E.; HATFIELD, D. Plasma volume, electrolyte, and endocrine changes during onset of laminitis hypertension in horses. **Am. J. Vet. Res.** v. 43, n. 9, p. 1551-1555, 1982.

DIAS, F. C. **Uso do software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. 2008/145f. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Especiais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2008.

FERREIRA, A. A.; KRAUSE, C. I.; COSTA, M. H.; RIVERO, E. R. C.; TARQUÍNIO, S. B. C. An image processing software applied to oral pathology. **Pathology – Research and Practice**. v. 207, p. 232-235, 2011.

FOWDEN, A. L.; LI, J.; FOREHEAD, A. J.; et al. Hormones as nutritional signals during intrauterine development. Third International Workshop on Equine Perinatology: Comparative Aspects. **Equine Veterinary Journal**. v. 30, p.468, 1998.

GARNER, H. E.; COFFMAN, J. R.; HAHN, A. W.; SALEM, C.; JOHNSON, J.A. Arterial pressure, cardiac output, plasma volume and L-lactate changes in equine laminitis. **The Physiologist**, v. 18, p. 224-229, 1975.

GILES, R. C.; DONAHUE, J. M.; HONG, C. B.; TUTTLE, P. A.; PETRITES-MRPHY, M. B.; POONACHA, K. B.; ROBERTS, A. W.; TRAMONTIN, R. R.; SMITH, B.; SWERCZEK, T. W. Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3,527 cases (1986-1991). **J Am Vet Med Assoc**. v. 203, p. 1170–1175, 1993.

GINTHER, O. J. Equine pregnancy; physical interactions between the uterus and conceptus. In: **44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. Maryland, Baltimore. Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY, v. 44, p. 73-104, 1998. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

HELMY, I. M.; ABDEL-AZIM, A. M. Efficacy of ImageJ in the assessment of apoptosis. **Diagnostic Pathology**. Disponível em: <http://www.diagnosticpathology.org/content/7/1/15>, v. 7, n. 15, p. 1-6, 2012.

HONG, C. B.; DONAHUE, J. M.; GILES, R. C.; PETRITES-MURPHY, M. B. Jr.; POONACHA, K. B.; ROBERTS, A. W.; SMITH, B. J.; TRAMONTIN, R. R.; TUTTLE, P. A.; SWERCZEK, T. W. Adenomatous hyperplasia of the equine allantoic epithelium. **Veterinary Pathology**. v. 30, n. 2, p.171-175, 1993a.

HONG, C. B.; DONAHUE, J. M.; GILES, R. C.; PETRITES-MURPHY, M. B. Jr.; POONACHA, K. B.; ROBERTS, A. W.; SMITH, B. J.; TRAMONTIN, R. R.; TUTTLE, P. A.; SWERCZEK, T. W. Etiology and Pathology of Equine Placentites. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 5, p.55-63, 1993b.

JOHNSON, P. J., MESSER, N. T., SESHU, I. V., GANJAM, K, WIEDMEYER, C. E. Pregnancy-Associated Laminitis in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 29, n. 1, p. 42-46, 2009.

KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S. Aspects of human feto-placental vasculogenesis and angiogenesis II. Changes during normal pregnancy. **Placenta**. v. 25, p. 114-126, 2004.

LAUGIER, C.; FOUCHER, N.; SEVIN, C.; LEON, A.; TAPPREST, J. A 24-Year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 31, p. 116-123, 2011.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**. v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LE BLANC, M. M. Ascending Placentitis in the Mare: An Update. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 28-34, 2010.

LE BLANC, M. M.; MACPHERSON, M.; SHEERIN, P. Ascending Placentitis: What We Know About Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. In: **50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Denver,

Colorado, (Ed.). Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)). 2004.

MACDONALD, A.A.; CHAVATTE P.; FOWDEN A.L. Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. **Placenta**, v.21, p. 565–574, 2000.

MACPHERSON, M. L. Diagnosis and treatment of equine placentitis. **Vet Clin Equine**. v. 22, p. 763-766, 2006.

MACPHERSON, M. L.; BAILEY, S. Treating the mare with placentitis: A clinical approach. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 28, n. 11, p. 703-708, 2008.

MORRESEY, P. R. Prenatal and perinatal indicators of neonatal viability. **Clin Tech Equine Pract**. v.4, p. 238-249, 2005.

OZERDEM, U.; WOJCIK, E. M; BARKAN, G. A.; DUAN, X.; ERŞAHIN, Ç. A practical application of quantitative vascular image analysis in breast pathology. **Pathology – Research and Practice**. v. 209, p. 455-458, 2013.

RUSSEL, C. M.; WILKINS, P. A. Evaluation of the recumbent neonate. **Clin Tech Equine Pract**. v. 5, p. 161-171, 2006.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, H. D. Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. **J. Reprod. Fert.** v. 41, p. 441-445, 1974.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, H. D. Studies on the equine placenta. II. Ultrastructure of the placental barrier. **J. Reprod. Fert.** v. 48, p. 257-264, 1976.

SCHLAFER, D. H. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: Methods and interpretation of findings. **Proceedings of the American Association on Equine Practitioners**. v. 50, p. 144-161, 2004.

SHIVAPRASAD, H. L.; SUNDBERG, J. P.; MCENTEE, K.; GORDON, L.; JOHNSTONE, A. C.; LOMBARDO DE BARROS, C. S.; HOFFMAN, R. L. Cystic adenomatous hyperplasia of the equine allantois: a report of eight cases. **J Vet Diagn Invest**. v. 6, n. 1, p. 107-110. 1994.

TROEDSSON, M. H. T. High risk pregnant mare. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 49 (suppl 1) S9, 2007.

WHITWELL, K. E.; JEFFCOTT, L. B. Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. **Research in Veterinary Science**. v. 19, p. 44-55, 1975.

WHITWELL, K. E. Infective placentitis in the mare. In: Powell DG, ed. **Equine infectious diseases V: proceedings of the Fifth International Conference**. Lexington, KY: University Press of Kentucky. p. 172-180, 1988.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. **Equine Veterinary Journal**. v. 35, n. 5, p. 476-483, 2003.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Factors influencing placental development and function in the mare. **Equine Veterinary Journal**. v. 44, suppl(41), p. 113-119, 2012.

WILSHER, S.; OUSEY, J.; ALLEN, W. R. Gross and histological observation on placentae from abnormal pregnancies. **Proceedings of a Workshop on Comparative Placentology in Havemeyer Foundation Monograph Series**. v. 17, p. 57-58, 2005.

WILSHER, S.; OUSEY, J.; WHITWELL, K.; CROWHURST, J. S.; NEAL, H. N.; ALLEN, W. R. Three types of anomalous vasculature in the equine umbilical cord. **Equine Veterinary Education**. v. 23, n. 3, p. 109-118, 2011.