

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



Tese

Aspectos morfovasculares e expressão de VEGF na placenta da égua

Luciana Araujo Lins

Pelotas, 2018

Luciana Araujo Lins

Aspectos morfovasculares e expressão de VEGF na placenta da égua

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna da Rosa Curcio

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L759a Lins, Luciana Araujo

Aspectos morfovasculares e expressão de VEGF na placenta da égua / Luciana Araujo Lins ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, orientador ; Bruna da Rosa Curcio, coorientadora. — Pelotas, 2018.

70 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Égua. 2. Placenta. 3. VEGF. 4. Laminite. 5. Estresse oxidativo. I. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, orient. II. Curcio, Bruna da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Luciana Araujo Lins

Aspectos morfovasculares e expressão de VEGF na placenta da égua

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

Data da Defesa: 07/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira (orientador)
Doutor em ciências veterinárias pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Antônio Sérgio Varela Junior
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande

Prof^a. Dr^a. Cristina Gevehr Fernandes
Doutora em patologia pela Universidade Estadual Paulista

Dr^a. Letícia Fiss
Doutora em ciências veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Alceu Pacheco Lins e Elisabete Araujo Lins e minhas irmãs, Aline Araujo Lins e Daniela Araujo Lins, por fazerem parte da minha vida e estarem sempre ao meu lado nas minhas vitórias e nos momentos mais difíceis.

Ao professor Carlos Eduardo Wayne Nogueira, por me permitir a construção deste trabalho, por sua extrema dedicação durante toda a minha formação acadêmica e por sua amizade.

À professora Bruna da Rosa Curcio por sua atenção e conhecimento dispensados para a execução deste trabalho.

À colega e amiga Fernanda Pazinato por sua incansável atenção a mim dispensada durante toda a execução do experimento.

À URCAMP (Universidade da Região da Campanha) por permitir a execução deste trabalho conciliado com minhas atividades docentes na instituição.

Ao amigo e colega Guilherme Araujo Collares da Silva, por auxílio em minhas atividades acadêmicas, me permitindo tempo para a execução desta tese.

Ao professor Antônio Sérgio Varela Junior, por seu tempo e conhecimento dispensados para a execução de importante etapa deste trabalho.

Em fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram de maneira positiva na construção deste trabalho.

Resumo

LINS, Luciana Araujo. **Aspectos morfovasculares e expressão de VEGF na placenta da égua**. 2018. 70f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Este trabalho teve por objetivo avaliar as modificações vasculares na placenta de éguas, com ênfase nos aspectos histológicos, proliferação vascular e expressão do fator de crescimento endotelial, ou VEGF. As modificações vasculares foram comparadas na placenta de éguas sadias e éguas com laminite crônica. São apresentados três artigos: O primeiro buscou estabelecer, em forma de revisão de literatura, os aspectos relacionados à ocorrência de estresse oxidativo na gestação da égua e sua relação com as modificações vasculares na placenta. Em um segundo momento foi demonstrada a expressão do VEGF na placenta de éguas. Um terceiro estudo avaliou as alterações histopatológicas na placenta de éguas com laminite crônica, com base na morfometria vascular, proliferação de tecido fibroso na parede dos vasos e a densidade vascular. Como principais conclusões foi verificado que a égua pode apresentar achados de insuficiência placentária tardios, semelhante aos encontrados em mulheres com preeclampsia, sendo que essas alterações podem estar associadas ao estresse oxidativo durante a gestação. A expressão de VEGF na placenta equina ocorre nas células trofoblásticas dos microvilos e região areolar, além de parede e endotélio vascular. Também foi demonstrado que éguas com laminite crônica apresentam maior proliferação vascular no corpo e corno grávido da placenta, além de redução da luz vascular, com aumento da espessura da parede vascular caracterizado por deposição de tecido conjuntivo fibroso no corno não-grávido.

Palavras-chave: Égua; placenta; VEGF; laminite; estresse oxidativo

Abstract

LINS, Luciana Araujo. **Morphovascular aspects and VEGF expression in mare placenta**. 2018. 70f. Tesis (Doctor Degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The aim of this study was to evaluate the vascular changes in the placenta of mares, with emphasis on histological aspects, vascular proliferation and expression of endothelial growth factor, or VEGF. Vascular modifications were compared in the placenta of healthy mares and mares with chronic laminitis. Three articles are presented: The first one sought to establish, in the form of a literature review, the aspects related to the occurrence of oxidative stress in the gestation of mare and its relation with the vascular modifications in the placenta. In a second moment the expression of VEGF in the placenta of mares was demonstrated. A third study evaluated the histopathological changes in the placenta of mares with chronic laminitis, based on vascular morphometry, proliferation of fibrous tissue in the vessel wall and vascular density. The main conclusions were that the mare may present with late placental insufficiency findings, similar to those found in women with preeclampsia, and that these alterations may be associated with oxidative stress during pregnancy. VEGF expression in the equine placenta occurs in the trophoblastic cells of the microvilli and areolar region, in addition to vascular wall and endothelium. It has also been demonstrated that mares with chronic laminitis show greater vascular proliferation in the body and pregnant horn of the placenta, as well as reduction of vascular lumen, with increased vascular wall thickness characterized by deposition of fibrous connective tissue in the non-pregnant horn.

Key-words: Mare; placenta; VEGF; laminitis; oxidative stress

Lista de Figuras

Artigo 2

- Figura 1 Avaliação histológica corada com HE da região microcotiledonária da placenta de éguas com laminite crônica (E) e do Grupo Controle (D). Área de fibrose (seta) em microcotilédone com arranjo circular em microcotilédone no Grupo Laminite..... 46
- Figura 2 Arteríolas da zona de transição do alantocócion da placenta de éguas do Grupo Laminite (A e B) e Grupo Controle (C e D), corados com Mallory. As setas indicam deposição de tecido conjuntivo fibroso na parede vascular, caracterizado por desorganização da camada média..... 46
- Figura 3 Médias e desvio-padrão da densidade vascular placentária, determinada em vaso/mm², no corpo uterino, corno grávido e corno não-grávido, em comparação do Grupo Laminite com o Grupo Controle..... 47
- Figura 4 Imunomarcção do VEGF na placenta de éguas do Grupo Controle (A-F) e do Grupo Laminite (G-L). Marcação do VEGF, em vermelho, no corpo da placenta (A e G), corno não-grávido (C e I) e corno grávido (E e K). Marcação dos núcleos, em azul, no corpo da placenta (B e H), corno não-grávido (D e J) e corno grávido (E e K)..... 49

Lista de Tabelas

Artigo 2

Tabela 1	Médias \pm erro padrão da média do diâmetro vascular total, diâmetro de luz vascular, espessura de parede vascular, relação da luz com o diâmetro vascular e percentual de deposição de tecido conjuntivo na parede dos vasos de placenta de éguas PSI a termo.....	47
Tabela 2	Médias e desvio padrão da moda dos valores observados de quantificação de fluorescência para VEGF em placentas de éguas com laminite e no Grupo Controle.....	48

Lista de Abreviaturas e Siglas

µm	Micrômetro
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ET1	Endotelina 1
GPx	Glutathiona peroxidase
Kg	Quilograma
mm ₂	Milímetro quadrado
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino
PIGF	Fator de crescimento placentário
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
VEGF	Fator de crescimento endotelial

Lista de Símbolos

°C	Graus celsius
%	Percentual
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Mn	Manganês
O ₂	Oxigênio
Se	Selênio
Zn	Zinco

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 Revisão de literatura	13
3.1 Placentação na égua	13
3.2 Vascularização placentária.....	14
3.3 Distúrbios na relação materno fetal	15
3.4. Fator de Crescimento Endotelial	17
4 Artigos.....	19
4.1 Artigo 1.....	19
4.3 Artigo 2.....	37
7 Considerações finais	55
Referências	56
Anexos	69

1 Introdução

A gestação é um processo dinâmico que compreende desde a concepção até o parto e este período é necessário para garantir o desenvolvimento do embrião e do feto, tornando-o capaz de sobreviver no meio externo. Para que a gestação ocorra normalmente, é necessário um ambiente uterino adequado, favorecendo as trocas gasosas e metabólicas entre a mãe e o feto, mediadas pela placenta.

A placenta representa a principal comunicação da mãe com o feto, já que ela determina a disponibilidade e transporte de nutrientes e oxigênio (JANSSON e POWELL, 2006; HAY Jr, 1995). Ela é composta por uma porção fetal, derivada do córion e outra materna, derivada de modificações do endométrio. É através da área de contato entre o córion e o endométrio que ocorrem as trocas gasosas e metabólicas (SEBASTIAN e BENIRSCHKE, 2004).

Os fatores de risco para disfunção placentária podem não ser facilmente reconhecidos e o seu diagnóstico representa um grande desafio para os clínicos (BUCCA, 2006). Em diversas situações os achados clínicos e macroscópicos da placenta podem não ser conclusivos para se estabelecer um diagnóstico de funcionalidade da placenta, sendo que o exame histopatológico pode complementar esta avaliação (SCHLAFER, 2004). O exame histopatológico identifica lesões não reconhecidas morfológicamente e é especialmente importante nas situações em que a égua não demonstra comprometimento durante a gestação (MORRESEY, 2005).

Doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e fungos produzem lesões que muitas vezes são sugestivas de determinada etiologia (HONG et al., 1993). Entretanto, a placenta pode também sofrer alterações funcionais que não refletem em lesões histopatológicas. Assim, os estudos da morfologia e modificações vasculares da placenta podem fornecer informações adicionais sobre a qualidade de trocas materno-fetais durante a gestação (ALLEN e WILSHER, 2009; PAZINATO et al., 2017).

Com base nestas descrições, este trabalho tem o objetivo de avaliar as modificações vasculares na placenta de éguas, com ênfase nos aspectos histológicos e proliferação vascular, assim como caracterizar a expressão de VEGF.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as modificações vasculares na placenta de éguas, com ênfase nos aspectos histológicos e proliferação vascular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do fator de crescimento endotelial, ou VEGF, na placenta de éguas;
- Determinar as modificações vasculares na placenta de éguas com laminite crônica;
- Verificar a proliferação vascular e expressão de VEGF na placenta de éguas com laminite crônica em comparação a éguas saudáveis;
- Estabelecer, em forma de revisão de literatura, os aspectos relacionados à ocorrência de estresse oxidativo na gestação da égua e sua relação com as modificações vasculares na placenta.

3 Revisão de literatura

3.1 Placentação na égua

A placentação da égua ocorre de forma não invasiva e depende de mínima resposta tecidual materna (GERSTENBERG, ALLEN e STEWART, 1999), resultando em uma placenta do tipo epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adecuada (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Por ser epiteliocorial, difusa e microcotiledonária, a placenta da égua possui a membrana coriônica em contato com o tecido endometrial, sendo esta membrana distribuída por todo o tecido materno e fixada através de microcotilédones (ALLEN et al., 2002). Durante a liberação da placenta no pós parto não ocorre a perda de tecido materno, o que a caracteriza como adecuada (GERSTENBERG, ALLEN e STEWART, 1999).

Na descrição de Allen e Wilsher (2009), a artéria vitelina se desenvolve no mesoderma vascularizado, entre o córion exterior e o saco vitelínico, no 20º dia após a ovulação. Por volta do 28º dia, o mesoderma vascularizado avança, mas uma pequena área de da membrana coriovitelinica não vascularizado persiste, o que acabará por tornar o ponto central de fixação do cordão umbilical (ALLEN, HAMILTON e MOOR, 1973). O trofoblasto é organizado em vilos coriônicos ramificados que se interdigitam com o epitélio endometrial para formar os microcotilédones (SAMUEL, ALLEN e STEVEN, 1975; SAMUEL, ALLEN e STEVEN, 1977).

Histologicamente, as duas camadas epiteliais da interface corioalantóide-endométrio permanecem estreitamente ligadas, mas ainda não estão fisicamente conectadas. A implantação ocorre quando o corioalantóide na região média ou equatorial do concepto torna-se estavelmente ligado ao endométrio por microvilosidades que se desenvolvem na superfície apical das camadas epiteliais (ALLEN, 2001; ABD-ELNAEIM et al., 2006). Estas vilosidades começam a interdigitar-se na superfície do endométrio e os leitos capilares se desenvolvem rapidamente, tanto na mesoderme fetal como no estroma endometrial sub-epitelial

(STEVEN, 1992). Cada ramo e sub-ramo do corioalantóide é fielmente espelhado pelo epitélio endometrial oposto, aumentando a área de contato entre trofoblasto e epitélio endometrial, a fim de maximizar a extensão das trocas materno-fetais (ALLEN, 2001; ABD-ELNAEIM et al., 2006). Com a contínua expansão da placenta por todo o útero, a justaposição dos microvilos do córion com o epitélio uterino torna-se mais complexa para permitir o aparecimento de milhares de estruturas microcotiledonárias que prendem firmemente a placenta (ALLEN, 2001; ALLEN et al., 2002).

Entre as espécies de grandes animais domésticos, o feto equino é provavelmente o mais lento na implantação e desenvolvimento de uma placenta estável para sustentar o crescimento intra-uterino a termo. A placentação inicia por volta do dia 40 de gestação, ocorrendo posteriormente um processo constante de desenvolvimento dos microcotiledones arquiteticamente complexos, a fim de permitir as trocas materno-fetais contínuas ao longo de toda a superfície do corioalantóide durante a gestação (ALLEN e WILSHER, 2009).

3.2 Vascularização placentária

O desenvolvimento da arquitetura vascular placentária continua de forma progressiva durante a gestação (DANTZER et al., 1988; LEISER e KOOB, 1992) e este processo é fundamental para permitir as trocas de nutrientes, oxigênio e dióxido de carbono entre a mãe e o feto (FABER e THORNBURG, 1983). Na égua, estas trocas são dependentes da vascularização materna e fetal, sendo que o volume de trocas é influenciado particularmente pelo tamanho dos microcotiledones, os quais aumentam gradativamente conforme avança a gestação (SAMUEL, ALLEN e STEVEN, 1974).

Samuel, Allen e Steven (1974) sugerem que o desenvolvimento dos microcotiledones é completado em torno do 150º dia de gestação. Contudo, em um estudo posterior, MacDonald, Chavatte e Fowden (2000) observaram um crescimento e ramificação constante dos vilos microcotiledonários até próximo do termo. O estímulo para a ramificação dos vilos fetais, particularmente próximo ao termo, não é totalmente conhecido, mas pode estar relacionado com as modificações endócrinas que ocorrem no feto e na égua durante o final da gestação.

Hormônios, como estrógenos, progestágenos, relaxina e prostaglandinas interferem no crescimento e proliferação celular nos tecidos reprodutivos durante a gestação (MACDONALD, CHAVATTE e FOWDEN, 2000).

Abd-Elnaeim et al. (2006) verificaram a presença de capilares dilatados ou sinusóides no início da gestação até próximo do termo, particularmente no topo dos vilos terminais, sendo que estes aumentam em número conforme avança a gestação. Os vilos terminais do tipo 1, no estudo de Abd-Elnaeim et al. (2006), não demonstraram claramente este fenômeno, o que sugere que estes podem estar ainda em desenvolvimento. No mesmo estudo, os vilos terminais do tipo 2 demonstraram diversas dilatações capilares típicas, indicando que estes não estavam mais em desenvolvimento e já representavam vilos maduros, com papel ativo no transporte placentário.

Este tipo de dilatação sinusóide oferece um aumento da superfície endotelial para a absorção e pode também tornar mais lento o fluxo sanguíneo localmente (LEISER et al., 1997). Este fator não interfere nas trocas transplacentárias de O₂ e CO₂ (FABER e THORNBURG, 1983), mas pode ajudar com o transporte mais lento, mas ainda ativo, de solutos (ALBERTS et al., 2003).

3.3 Distúrbios na relação materno fetal

Diversas condições podem expor a gestação da égua à riscos. As condições que contribuem para a interrupção da gestação tardia em éguas incluem agentes infecciosos, gestações gemelares, anormalidades fetais ou placentárias, modificações estruturais, como hidropsias ou ruptura do tendão pré-púbico, além de doenças sistêmicas (MACPHERSON, 2007). O feto equino é altamente dependente dos níveis de glicose e oxigênio do sangue materno para seu desenvolvimento e sobrevivência (COMLINE e SILVER, 1970; EVANS, 1971). Mesmo em episódios transitórios de desnutrição ou hipóxia podem ocorrer alterações metabólicas ou endócrinas no feto. Quando existe aporte nutricional limitado, os níveis fetais de insulina e tiroxina reduzem e aumentam os níveis de cortisol e prostaglandinas (FOWDEN, 1985), resultando em restrição no crescimento fetal (BUCCA, 2006). Estas modificações endócrinas são observadas quando o suprimento fetal é restrito por subnutrição materna, insuficiência placentária ou redução do fluxo sanguíneo

uterino ou do cordão umbilical (FOWDEN, 1985). Em geral, qualquer condição que altere a termorregulação, função endócrina ou metabólica da égua pode influenciar na circulação uterina, prejudicando o ambiente fetal (BUCCA, 2006).

Diversos veterinários relatam que algumas éguas parecem desenvolver ou agravar um quadro preexistente de laminite durante a gestação (JOHNSON et al., 2009). Garner et al. (1975a) relataram que a mudança na perfusão digital que ocorre durante a laminite está associada com significativas modificações hemodinâmicas sistêmicas, incluindo redução na pressão atrial direita, pressão arterial diastólica sistêmica e pressão arterial sistólica sistêmica (GARNER et al., 1975b). Esta queda de pressão é seguida de um aumento na pressão atrial direita, pressão arterial diastólica e pressão arterial sistólica. Estes resultados sugerem que significativas alterações cardiovasculares podem ocorrer em cavalos com laminite, o que eleva a liberação e ativação de mediadores vasoativos (EADES, HOLM e MOORE, 2002).

As Endotelinas são uma família de peptídeos (ET-1, ET-2, ET-3) produzidos por várias células e exercem diversos efeitos biológicos e fisiopatológicos (RUBANYI e POLOKOFF, 1994). A principal Endotelina de importância em doenças vasculares ou condições isquêmicas é a ET-1. A ET-1 é um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais, células musculares lisas dos vasos e macrófagos. Ele não apenas induz vasoconstrição prolongada em artérias e arteríolas como também causa profunda e intensa venoconstrição nas circulações sistêmica e pulmonar (EADES, HOLM e MOORE, 2002).

A síntese de ET-1 é estimulada pela epinefrina, fator de crescimento transformador, fator de ativação plaquetária e fator de necrose tumoral (LEVIN, 1995), os quais estão aumentados em diversas doenças dos cavalos caracterizadas por resposta inflamatória (ex. pleuropneumonia, endometrite, isquemia intestinal, enterocolite, enterite proximal, etc.) e são empiricamente relacionados ao desenvolvimento da laminite (EADES, HOLM e MOORE, 2002).

Situações de dor, que podem precipitar a liberação de epinefrina, podem estar relacionadas no desenvolvimento de hipertensão em diversas condições clínicas nos equinos, como a laminite (PARRY, 1984). A hipertensão em éguas gestantes, associada a laminite crônica, pode interferir na estrutura funcional da placenta, como espessamento vascular e redução da área vascular dos microcotilédones (PAZINATO et al., 2017).

3.4. Fator de Crescimento Endotelial

A circulação placentária promove ao concepto em desenvolvimento um ambiente uterino capaz de contemplar suas demandas metabólicas durante a gestação (McLEAN et al., 2017). Em ovelhas, alterações extensas no volume vascular, densidade e relação de vasos com o volume do tecido ocorrem durante o terço médio da gestação no útero e no terço final, nos tecidos fetais (BOROWICZ et al., 2007). Contudo, a angiogênese inicia durante o terço inicial da gestação para permitir o crescimento fetal e a identificação de reguladores deste processo é útil para entender a angiogênese durante a gestação. Estes reguladores incluem o fator de crescimento endotelial (VEGF), entre outros (BOROWICZ et al., 2007; GRAZUL-BILSKA et al., 2011).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica ligada por pontes dissulfeto que possui efeito mitogênico seletivo para células endoteliais e parece apresentar função principal na vasculogênese, angiogênese, controle da permeabilidade microvascular e na vasodilatação (CHEUNG, 1997). O VEGF é considerado em um fator de sobrevivência para as células endoteliais tanto *in vitro* como *in vivo* (YUAN et al., 1996). Em ratos, a inibição do VEGF resulta em extensas alterações mediadas por apoptose na vasculatura neonatal, mas não no adulto (GERBER et al., 1999). Da mesma forma, uma expressiva dependência do VEGF foi demonstrada em células endoteliais recém-formadas, mas não nos vasos já estabelecidos em tumores (YUAN et al., 1996).

Embora as células endoteliais sejam o principal alvo do VEGF, diversos estudos relataram efeitos mitogênicos em outros tipos celulares, como epitélio pigmentar da retina, ductos pancreáticos, células de Schwann e células alveolares (FERRARA, 2004). Estudos em equinos descrevem o comportamento do VEGF em diversos tecidos, como pulmonar (HUANG et al., 2007) e corpo lúteo (AL-ZI'ABI, WATSON e FRASER, 2003) entre outros, mas não descrevem seu comportamento na placenta.

O VEGF foi estudado na placenta de humanos por Trollman et al. (2003), Ahmad e Ahmed (2004), Sgambati et al. (2004) e Ibba-Manneschi et al. (2010) em situações clínicas, demonstrando particular relação com insuficiência placentária. Outros fatores angiogênicos da placenta, como o fator de crescimento placentário

(PIGF) foi estudado em ratos por Rätsep et al. (2014), em humanos por Triunfo et al. (2016) e em ovelhas por Carr et al. (2016). Como o VEGF e PIGF modulam a função do trofoblasto e a dinâmica vascular na unidade útero-placentária, alterações na função ou na expressão destas proteínas podem resultar em consequências críticas à função placentária (SHOREA et al., 1997).

A hipóxia é um potente estímulo para a indução da expressão gênica do VEGF, além de aumentar a estabilidade do mRNA do VEGF (TAYLOR et al., 1997). Em humanos, estudos da expressão placentária de VEGF em gestações complicadas por distúrbios hipertensivos caracterizam redução deste fator, enquanto de outros estudos demonstram elevação do mesmo (SGAMBATI et al., 2004).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Estresse oxidativo na gestação: Qual a percepção na espécie equina? – Revisão

Luciana Araujo Lins, Fernanda Maria Pazinato, Bruna da Rosa Curcio, Carlos
Eduardo Wayne Nogueira

Publicado na revista Science and Animal Health

ESTRESSE OXIDATIVO NA GESTAÇÃO: QUAL A PERCEPÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA? - REVISÃO

Luciana Araujo Lins, Fernanda Maria Pazinato, Bruna da Rosa Curcio, Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Publicado na revista Science and Animal Health

ESTRESSE OXIDATIVO NA GESTAÇÃO: QUAL A PERCEPÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA? - REVISÃO

RESUMO

Esta revisão busca evidências da manifestação de estresse oxidativo na gestação de equinos e consequências no período neonatal. Alterações na perfusão placentária na égua podem ocorrer em estágios tardios de desenvolvimento fetal, resultando em potros com baixo peso ao nascimento ou graus variáveis de imaturidade. Em humanos, o estresse oxidativo está envolvido em situações de hipóxia nas gestações de risco, como preeclampsia, hipertensão induzida pela gestação ou diabete melito. O aporte de oxigênio durante a gestação é bastante elevado, podendo cursar com a produção de espécies reativas de oxigênio, além de falha dos mecanismos de proteção antioxidante, o que causa o dano oxidativo. O papel do estresse oxidativo na gestação em humanos é bastante descrito e diretamente relacionado com alterações fetais e neonatais, sendo que no equino este processo ainda não está estabelecido. Éguas gestantes com laminite crônica apresentam síndrome hipertensiva, como a que ocorre em mulheres, causando a produção de placentas mais leves e redução da luz vascular, semelhante aos achados observados na placenta de mulheres com hipertensão. Os radicais livres tem sido relacionados com a patogenia da sepse neonatal, baixo peso ao nascer e encefalopatia neonatal em humanos. Estudos em potros demonstram redução dos mecanismos antioxidantes nos neonatos severamente acometidos clinicamente, mas não expressam indícios de dano oxidativo instalado. Esta revisão evidencia que a égua pode apresentar achados de insuficiência placentária tardios, semelhante aos encontrados em mulheres com preeclampsia, sendo que essas alterações podem estar relacionadas a manifestações de estresse oxidativo durante a gestação.

Palavras-Chave: Égua. Gestação. Estresse Oxidativo. Placenta.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo eleva durante a gestação devido ao aumento do aporte de oxigênio e utilização de energia (TOESCU et al., 2002). Este processo ocorre quando existe a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e falha dos mecanismos de proteção antioxidante (SOFFLER, 2007). Em mamíferos a placenta é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido sua extensa divisão celular e alta atividade metabólica (BURTON et al., 2003; JAUNIAUX et al., 2006).

Situações de hipóxia transitória ou reações inflamatórias podem gerar estresse oxidativo, ocorrendo geralmente a estabilização do processo pela ação dos mecanismos antioxidantes. No entanto, quando há um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e sua estabilização pelos antioxidantes, ocorre o dano oxidativo (SOFFLER, 2007; KIRSCHVINK et al., 2008). O papel do estresse oxidativo na gestação em humanos é bastante descrito e diretamente relacionado com alterações fetais e neonatais (FURNESS et al., 2011). Em equinos, no entanto, ainda não foram estabelecidos os detalhes relacionados ao papel das ROS, estresse oxidativo e os seus impactos na gestação.

Contudo, uma das principais causas de inviabilidade fetal e neonatal em equinos está relacionada à insuficiência placentária. O déficit de uma área placentária funcional suficiente para intercâmbio de nutrientes e trocas gasosas pode promover graus variados de isquemia fetal, cursando com o nascimento de potros fracos, de abortos ou natimortos (NOGUEIRA; LINS, 2009).

Esta revisão aborda o efeito das ROS e mecanismos antioxidantes durante a gestação, assim como as consequências no período perinatal, buscando evidências da manifestação destes processos em equinos.

PLACENTAÇÃO NA ÉGUA

Na descrição de Allen e Wilsher (2009), a artéria vitelina se desenvolve no mesoderma vascularizado, entre o córion exterior e o saco vitelínico, no 20º dia após a ovulação. Por volta do 28º dia, o mesoderma vascularizado avança, mas uma pequena área de da membrana coriovitelinica não vascularizado persiste, o que acabará por tornar o ponto central de fixação do cordão umbilical (ALLEN et al., 1973).

Histologicamente, as duas camadas epiteliais da interface corioalantóide-endométrio permanecem estreitamente ligadas, mas ainda não estão fisicamente conectadas. A implantação ocorre quando o corioalantóide na região média ou equatorial do concepto torna-se estavelmente ligado ao endométrio por microvilosidades que se desenvolvem na superfície apical das camadas epiteliais. Estas vilosidades começam a interdigitar-se na superfície do endométrio e os leitos capilares se desenvolvem rapidamente, tanto na mesoderme fetal como no estroma endometrial sub-epitelial. Cada ramo e sub-ramo do corioalantóide é fielmente espelhado pelo epitélio endometrial oposto, aumentando a área de contato entre trofoblasto e epitélio endometrial, a fim de maximizar a extensão das trocas materno-fetais (STEVEN, 1992).

Entre as espécies de grandes animais domésticos, o feto equino é provavelmente o mais lento na implantação e desenvolvimento de uma placenta estável para sustentar o crescimento intra-uterino a termo. A placentação inicia por volta do dia 40 de gestação, ocorrendo posteriormente um processo constante de desenvolvimento dos microcotiledones arquiteticamente complexos, a fim de permitir as trocas materno-fetais contínuas ao longo de toda a superfície do corioalantóide durante a gestação (ALLEN; WILSHER, 2009).

Desta forma, fica evidente que a placentação da égua é pouco dependente da vascularização miometrial, porque a vascularização inicial ocorre a partir do concepto. Entretanto, alterações na perfusão placentária podem ocorrer em estágios mais tardios de desenvolvimento fetal, em éguas que apresentam degeneração miometrial fibrosa ou éguas primíparas, devido o sub-desenvolvimento dos microcotilédones placentários, resultando em potros com baixo peso ao nascimento ou graus variáveis de imaturidade (ALLEN; WILSHER, 2009).

ESTRESSE OXIDATIVO

Apesar de o oxigênio ser fundamental para permitir as funções orgânicas dos animais, o excesso em sua formação pode ser prejudicial. Isso porque parte dos elétrons provenientes da cadeia respiratória ativa parcialmente o oxigênio, produzindo ROS. Neste conceito, são agrupadas moléculas de oxigênio ou compostos mistos de oxigênio com

hidrogênio e nitrogênio, com alta capacidade de ligação e capazes de provocar danos a macromoléculas, material genético e estruturas celulares em geral (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Fisiologicamente, a defesa contra os danos provocados por ROS é realizada por meio de elementos antioxidantes presentes nas células e circulantes na corrente sanguínea. A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou de propagação dos processos oxidativos, minimizando o dano de oxidação das moléculas e estruturas celulares (SIES, 1991). Existem diversos mecanismos de defesa intracelular para prevenir o dano oxidativo. Estes sistemas de defesa são classificados como enzimáticos – superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase – e não enzimáticos – vitaminas e eletrólitos (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; AYDEMIR et al., 2000).

O principal papel dos antioxidantes consiste na inativação ou transformação dos oxidantes, os quais podem ser tanto transformados por enzimas antioxidantes em formas menos reativas ou podem reagir com moléculas antioxidantes, as quais são quimicamente estáveis. As enzimas antioxidantes mais importantes são SOD, CAT e GPx (FRIDOVICH, 1995). A atividade catalítica destas enzimas permite a transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água, desta forma inativando importantes volumes de oxidantes. Elementos minerais, como selênio (Se), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) desempenham um importante papel catalítico para a atividade enzimática de GPx (Se) e SOD (Zn, Mn, Cu) (MAUGHAN, 1999; MATES, 2000).

Entretanto, moléculas antioxidantes pequenas são os antioxidantes endógenos mais numerosos (CHEESMAN; SLATER, 1993). Exceto pelo ácido lipólico, o qual atua como antioxidante hidrofílico e hidrofóbico (BAST; HAENE, 2003), a maioria dos antioxidantes endógenos pode ser dividida em dois grupos: (1) hidrofóbicos, como vitamina E, Vitamina A, flavonoides, ubiquinol, bilirrubina e melatonina, os quais estão essencialmente protegendo os lipídeos das reações de peroxidação; (2) hidrofílicos, como glutaciona, ácido úrico, ácido ascórbico, tióis, proteoglicanos e ácido hialurônico, protegem contra peroxidação lipídica, assim como a oxidação de proteínas, carboidratos e material nuclear (KIRSCHVINK et al., 2008).

Sempre que há excesso de produção de oxidantes, ou uma menor disponibilidade de antioxidantes, ocorre um desequilíbrio oxidativo potencialmente lesivo às células e ao organismo como um todo, a que se convencionou chamar de estresse oxidativo (SIES, 1991).

O estresse oxidativo se refere ao desequilíbrio na produção de ROS e defesas antioxidantes. O estresse oxidativo pode causar dano em todo tipo de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios, podendo produzir danos irreversíveis que levam a morte celular, tanto por necrose como por apoptose (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). A resposta inflamatória determina a liberação de radicais livres de oxigênio e, nesse ponto, muito se tem estudado a respeito do estresse oxidativo na sepse. A sepse gera um estado de desequilíbrio entre produção de oxidantes e antioxidantes, gerando um excesso de radicais livres de oxigênio, com a função de destruir o agente agressor. Entretanto, por serem inespecíficas, acabam por determinar lesão também no organismo (MACDONALD et al., 2003).

Os radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons não pareados. As reações de oxidação derivam da necessidade destes elétrons em se estabilizar, formando novas ligações com outros elétrons (KIRSCHVINK et al., 2008). Os compostos derivados do oxigênio, como o ozônio e o peróxido de oxigênio, são mais reativos que o próprio oxigênio e capazes de induzir lesões oxidativas (SOFFLER, 2007). Tanto os radicais livres de oxigênio como os compostos derivados são denominados de ROS. A redução do oxigênio resulta na formação de ânions superóxidos. Os ânions superóxido apresentam tanto uma ação oxidativa, sendo reduzidos à peróxido de hidrogênio, como uma função redutora, retornando a oxigênio. A formação de peróxido de hidrogênio pode ocorrer espontaneamente, mas a maior taxa de reação sob condições fisiológicas ocorre quando catalisada pela superóxido dismutase – SOD (SOFFLER, 2007; KIRSCHVINK et al., 2008). As ROS podem causar danos em lipídios, proteínas e DNA, como também apresentam efeito pró-inflamatório. Os danos às proteínas podem causar alterações estruturais e alterar atividades enzimáticas, como por exemplo, da SOD (SOFFLER, 2007).

PAPEL DO ESTRESSE NA GESTAÇÃO

A gestação é um processo fisiológico que apresenta uma crescente susceptibilidade ao estresse oxidativo (KONTIC-VUCINIC et al., 2008). As ROS e espécies de nitrogênio associadas à inflamação causam dano ao DNA. O dano ao DNA pode afetar múltiplos processos fisiológicos associados com a gestação, desde os estágios iniciais como a

maturação oocitária e qualidade espermática, até processos tardios, envolvidos do desenvolvimento placentário e fetal. Desta forma, a capacidade de reparação do DNA se apresenta reduzida nas gestantes, tornando-as mais susceptíveis a transtornos ambientais e toxinas endógenas que causam doença (SKONER et al., 1995). Defeitos na placentação levam à hipóxia placentária e lesão por reperfusão, devido à isquemia. Como resultado, as ROS induzem a liberação de citocinas, causando lesão endotelial (MALEK et al., 2001).

O estresse oxidativo é geralmente mais elevado durante a gestação devido ao aumento do aporte de oxigênio e utilização de energia (TOESCU et al., 2002). Por outro lado, em humanos, o estresse oxidativo está envolvido em situações de hipóxia nas gestações de risco, como preeclampsia, hipertensão induzida pela gestação ou diabetes melito (GUPTA et al., 2005; BAYHAN et al., 2005). O estresse oxidativo causa disfunção vascular na placenta (HUBEL, 1999) e o baixo aporte de oxigênio leva a uma diferenciação anormal do trofoblasto, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo placentário e dano ao tecido fetal (GRANGER et al., 2002; MYATT, 2006).

Os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário humano ocorrem em um ambiente com baixa tensão de oxigênio (BURTON et al., 2003), o que parece limitar a geração de ROS (JAUNIAUX et al., 2000). No entanto, ocorre uma oxigenação crescente da placenta durante o primeiro semestre, gerando um aumento na capacidade antioxidante (FUJIMAKI et al., 2011). A alta demanda por oxigênio da mãe e do feto aumenta o metabolismo durante a gestação, desta forma, aumentando a geração dos radicais livres (WISDOM et al., 1991).

O desequilíbrio oxidante/antioxidante em éguas durante a gestação se manifesta a partir do sexto mês, quando ocorre um maior desenvolvimento do feto e placenta. Os níveis de SOD se elevam a partir deste período até duas semanas após o parto, apresentando redução na quarta semana pós-parto. Já a atividade de GPx apresenta redução significativa a partir de duas semanas após o parto. Estes dois dados indicam que o período perinatal concentra as maiores alterações no equilíbrio antioxidante na égua gestante (GÓRECKA et al., 2002). Dados em éguas vazias pré-concepção demonstram redução das taxas de GPx em éguas consideradas inférteis, caracterizando uma maior produção de ROS nestas. Enquanto que, no mesmo grupo de animais, houve um aumento do nível de SOD associado com redução de Cu e Zn. Assim, a redução dos elementos minerais, já que os dois citados atuam

como auxiliares da atividade catalítica de SOD, pode ter causado redução da atividade desta enzima nas éguas inférteis (AMAL, FAWZIA, FATEN, 2012).

Um dos principais problemas que ocorrem na gestação em humanos é a preeclampsia (KIMURA et al., 2013), cuja patogenia básica consiste em lesão endotelial (ROBERTS et al., 1989). O endotélio vascular regula o tônus muscular produzindo vasoconstritores, como endotelina-1 e tromboxano, além de vasodilatadores, como prostaciclina e óxido nítrico. A lesão endotelial reduz a produção de vasodilatadores e pode aumentar a produção de vasoconstritores, resultando em vasoespasmo (HUBEL et al., 1989). Os principais problemas devidos a esta condição estão relacionados com seu desenvolvimento precoce, no início da gestação (SIBAI, 2006). O início tardio da condição é relacionado com uma melhor resistência uterina, pouco envolvimento fetal e um período perinatal mais saudável (SIBAI et al., 2005; NESS; SIBAI, 2006).

Éguas gestantes com laminite crônica apresentam síndrome hipertensiva, semelhante ao que ocorre em mulheres. Estas éguas demonstram menor tempo de gestação, placentas mais leves e com alterações morfométricas, como redução da luz vascular e aumento da espessura da parede dos vasos. Estes achados parecem ser relacionados à hipertensão, sendo necessários outros estudos para evidenciar o real impacto da laminite crônica em éguas gestantes (PAZINATO et al., 2015). Achados como estes são descritos em mulheres com preeclampsia (DUCRAY et al., 2011; SOUSA et al., 2008) ou demais síndromes hipertensivas (IBBA-MANNESCHI et al., 2010; CORREA et al., 2008; NOORI et al., 2010). Essas lesões são associadas a redução da perfusão útero-placentária, caracterizada por redução da luz vascular em função do espessamento da parede devido à deposição da fibrose (IBBA-MANNESCHI et al., 2010).

Esses eventos demonstrados na gestação em equinos parecem semelhantes ao descrito por Kimura et al. (2013) em relação à preeclampsia de início tardio, ocorrendo nos terços médio e final da gestação, o que parece causar menos danos ao feto. No entanto, estudos mais direcionados são necessários para investigar a importância clínica deste processo.

CONSEQUÊNCIAS DO ESTRESSE OXIDATIVO

O período perinatal é crítico para a manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e a proteção antioxidante no feto e neonato (SCHOLL; STEIN, 2001; WANG; WALSH, 2001). A transição da vida fetal para a neonatal induz mudanças fisiológicas agudas e complexas. Durante o parto, o feto é transferido de um ambiente intra-uterino com baixa tensão de oxigênio, a um ambiente com tensão alta de O₂ (MUTINATI et al., 2014). Este aumento da tensão de oxigênio induz uma elevada produção de ROS. Além disso, os recém-nascidos são mais suscetíveis a desenvolver processos infecciosos ou inflamatórios, os quais causam redução das defesas antioxidantes, elevando os riscos do estresse oxidativo (MUTINATI et al., 2014).

Sgorbini et al. (2015) sugerem que a placenta da égua apresenta um papel protetivo para a captação de radicais livres por parte do feto, assim como já é descrito em humanos (QANUNGO et al., 1999; LISTA et al., 2010), bovinos e ovinos (CASTILLO et al., 2005; RIZZO et al., 2013). Este papel foi demonstrado por Sgorbini et al. (2015) através das taxas de metabólitos reativos do oxigênio e potencial biológico antioxidante no sangue materno, cordão umbilical e feto. As taxas dos dois marcadores demonstram valores mais baixos no sangue fetal, seguido do cordão, demonstrando que a maior produção de radicais livres se concentra no sangue materno. Este dado parece indicar que uma falha placentária na égua durante a gestação, pode limitar este fator de proteção, favorecendo a exposição do feto ao estresse oxidativo no útero ou peri-parto.

Os radicais livres tem sido relacionados com transtornos neonatais em humanos, como a septicemia (KAPOOR et al., 2006; CANCELIER et al., 2009), baixo peso ao nascer (SCHOLL; STEIN, 2001; WANG; WALSH, 2001; NEGI et al., 2012) e encefalopatia neonatal (CALVERT; ZHANG, 2005; KUMAR et al., 2008; WONG et al., 2011). McKenzie e Furr (2001) descrevem a ocorrência de estresse oxidativo em neonatos equinos sépticos após a ativação de macrófagos, a fim de destruir o produto fagocitado, o que leva a persistência da reação inflamatória. Não descrevem, entretanto, a implicância clínica do estresse oxidativo nos potros neonatos.

O estresse oxidativo pode ser um fator determinante da mortalidade neonatal. Furr et al. (2012) encontraram taxas reduzidas de selênio sérico em potros doentes em

comparação a potros sadios, caracterizando déficit nos mecanismos antioxidantes. Os autores também encontraram redução significativa da concentração de 3-nitrotirosina em potros severamente acometidos, o que vem ao encontro dos estudos em humanos, que demonstram elevação das taxas de 3-nitrotirosina em neonatos doentes (CANCELIER et al., 2009; KAPOOR et al., 2006). Entretanto, a ocorrência de estresse oxidativo, demonstrado pelas taxas de glutathiona peroxidase, não foi comprovada em potros neonatos doentes (FURR et al., 2012).

Estes dados demonstram que doenças perinatais em humanos, como sepse e retardo de desenvolvimento intra-uterino, são associadas com alterações no estresse oxidativo e concentração de moléculas antioxidantes. Entretanto, esta relação não está bem definida em equinos neonatos (FURR et al., 2012).

CONCLUSÃO

Esta revisão evidencia que a égua pode apresentar achados de insuficiência placentária tardios, semelhante aos encontrados em mulheres com preeclampsia, sendo que essas alterações podem estar associadas ao estresse oxidativo durante a gestação.

Estudos em potros demonstram redução dos mecanismos antioxidantes nos neonatos severamente acometidos clinicamente, mas não expressam indícios de dano oxidativo instalado.

OXIDATIVE STRESS IN PREGNANCY: WHAT IS THE PERCEPTION IN THE EQUINE SPECIES? – A REVIEW

ABSTRACT

This review searches for evidences of oxidative stress manifestation in equine pregnancy, as its consequences on neonatal period. Changes in placental perfusion in the mare may occur in late stages of fetal development, resulting in foals showing low birth weight or variable grades of immaturity. In human, oxidative stress is involved on hypoxic situations on risk pregnancies, as preeclampsia, pregnancy induced hypertension, or diabetes mellitus. Oxygen intake during pregnancy is quite elevated, leading to reactive oxygen species production,

besides lack on antioxidant protective mechanisms, causing oxidative damage. The role of oxidative stress on human pregnancy is well described and is directly related to fetal and neonatal disturbs, but this process is not yet established on equine specie. Pregnant mares with chronic laminitis presents hypertensive syndrome, as showed in women, leading to production of heavier placentas and lower lumen vessel diameter, similar to the findings of placentas of hypertensive women. Free radical has been related to neonatal sepsis pathogenesis, low birth weight and neonatal encephalopathy in humans. Researches on foals showed reduced antioxidant mechanisms on severely affected newborns, but they not express oxidative damage. This review shows that the mare may exhibit late placental insufficiency findings, similar to those found in women with preeclampsia, and those alterations may be related to oxidative stress during pregnancy.

Key-words: Mare. Pregnancy. Oxidative stress. Placenta.

ESTRÉS OXIDATIVO EN LA GESTACIÓN: SU PERCEPCIÓN EN LA ESPECIE EQUINA – REVISIÓN

RESUMEN

Esta revisión busca evidencias de la manifestación del estrés oxidativo en la gestación equina e sus consecuencias en el periodo neonatal. Alteraciones en la perfusión placentaria en la yegua pueden ocurrir en condiciones tardías de desarrollo fetal, lo que resulta en potros livianos al nacimiento o en variables grados de inmadurez. En los humanos el estrés oxidativo está implicado en situaciones de falta de oxígeno en las gestaciones de riesgo, como preeclampsia, hipertensión inducida por la gestación o mismo la diabetes mellitus. El aporte de oxígeno durante la gestación es muy elevado, llevando a cursar con la producción de especies reactivas de oxígeno y también de la falla en los mecanismos de protección antioxidante, o que llevaría al daño oxidativo. El papel del estrés oxidativo en la gestación humana es bien descrito y directamente relacionado con alteraciones fetales y neonatales, siendo que en el equino este proceso no se conoce muy bien. Yeguas embarazadas con laminitis crónica sufren de síndrome hipertensiva, como la que ocurre en las mujeres, llevando a producción de placentas más livianas y reducción del agujero de los vasos sanguíneos, semejantes a los observados en la placenta de mujeres con hipertensión. Los radicales libres son relacionados con la patogénesis de la sepsis neonatal, bajo peso al nacer y encefalopatía neonatal en humanos. Estudios en potros demuestran reducción de los mecanismos antioxidantes en neonatos muy acometidos clínicamente, pero no demuestran indicios de daño oxidativo instalado. Esta revisión junta evidencias de que la yegua puede presentar muestras de insuficiencia placentaria tardía, semejante a los encontrados en mujeres con preeclampsia y esas alteraciones pueden estar relacionadas a manifestaciones del estrese oxidativo durante la gestación.

Palabras-Clave: Yegua. Gestación. Estrese Oxidativo. Placenta.

BIBLIOGRAFIA

ALLEN, W.R.; HAMILTON, D.W.; MOOR, R.M. The origin of the equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. **The Anatomical Record**, v.177, p.485–502, 1973.

ALLEN, W.R.; WILSHER, S.A. Review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v.30, p.1005–1015, 2009.

AMAL, M.A.E.; FAWZIA, Y.H.S.; FATEN, I.G. Antioxidants markers, trace minerals and steroid hormones in preconceptional arab mares. **Global Veterinaria**, v.9, n.3, p.311-318, 2012.

AYDEMIR, T.; OZTURK, R.; BOZKAYA, L.A.; TARHAN, L. Effect of antioxidant vitamins A, C, E and trace elements Cu, Se on CuZnSOD, GSHPx, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v.18, p.109-115, 2000.

BAST, A.; HAENEN, G.R. Lipoic acid: A multifunctional antioxidant. **Biofactors**, v.17, p.207–213, 2003.

BAYHAN, G.; KOCYIGIT, Y.; ATAMER, A.; et al. Potential atherogenic roles of lipids, lipoprotein(a) and lipid peroxidation in preeclampsia. **Gynecological Endocrinology**, v.21, p.1–6, 2005.

BURTON, G.J.; HEMPSTOCK, J.; JAUNIAUX, E. Oxygen, Early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. **Reproductive Biomedicine Online**, v.6, p.84–96, 2003.

CALVERT, J.W.; ZHANG, J.H. Pathophysiology of a hypoxic-ischemic insult during the perinatal period. **Neurology Research**, v.27, n.3, p.246-260, 2005.

CANCELIER, A.C.; PETRONILHO, F.; REINKE, A.; et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: A case-control study. **Pediatric Critical Care Medicine**, v.10, n.4, p.467-471, 2009.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; et al. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Veterinary Journal*, v.169, p.286–292, 2005.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, v.49, p.481–493, 1993.

CORREA, R.R.; GILIO, D.B.; CAVELLANI, C.L.; et al. Placental morphometrical and histopathology changes in the different clinical presentations of hypertensive syndromes in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v.277, n.3, p.201–206, 2008.

DUCRAY, J.F.; 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 e Gynecology and Reproductive Biology*, n.156, p.29–34, 2011.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, v.64, p.97–112, 1995.

FUJIMAKI, A.; WATANABE, K.; MORI, T.; et al. Placental oxidative DNA damage and its repair in preeclamptic women with fetal growth restriction. *Placenta*, v.32, p.367-372, 2011.

FURNESS, D.L.F.; DEKKER, B, G.A.; ROBERTS, C.T. Review - DNA damage and health in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, n. 89, p. 153–162, 2011.

FURR, M.; FRELLSTEDT, L.; GEOR, R. Sick Neonatal foals do not demonstrate evidence of oxidative stress – Short communication. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.32, n.5, p.297-299, 2012.

GÓRECKA, R.; KLECZKOWSKI, M.; KLUCINSKI, W.; KASZTELAN, R.; SITARSKA, E. Changes in antioxidant components in blood of mares during pregnancy and after foaling. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.46, p.301-305, 2002.

GRANGER, J.P.; ALEXANDER, B.T.; LLINAS, M.T.; et al. Pathophysiology of preeclampsia: Linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. **Microcirculation**, v.9, p.147–160, 2002.

GUPTA, S.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. **Obstetrical e Gynecological Survey**, v.60, p.807–816, 2005.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715–725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. Londres:Oxford University press, 1999. pp.936.

HUBEL, C.A.; ROBERTS, J.M.; TAYLOR, N.R.; et al. Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.161, p.1025-1034, 1989.

HUBEL, C.A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.222–235, 1999.

IBBA-MANNESCHI, L.; MANETTI, M.; MILIA, A.F.; et al. Severe fibrotic changes and altered expression of angiogenic factors in maternal scleroderma: Placental findings. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.69, p.458–461, 2010.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A.L.; HEMPSTOCK, J.; et al. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: A possible factor in human early pregnancy failure. **American Journal of Pathology**, v.157, p.2111–2122, 2000.

JAUNIAUX, E.; POSTON, L.; BURTON, G.J. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. **Human Reproduction Update**, v.12, p.747–755, 2006.

KAPOOR, K.; BASU, S.; DAS, B.; et al. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.52, p.372–375, 2006.

KIMURA, C.; WATANABE, K.; IWASAKI, A.; et al. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v.26, n.5, p.491–496, 2013.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinary Journal**, v.177, p.178-191, 2008.

KONTIC-VUCINIC, O.; TERZIC, M.; RADUNOVIC, N. The role of antioxidant vitamins in hypertensive disorders of pregnancy. **Journal of Perinatology. Medicine**, v.36, n.4, p.282–290, 2008.

KUMAR, A.; RAMAKRISHNA, S.; BASU, S.; et al. Oxidative stress in perinatal asphyxia. **Pediatrics Neurology**, v.38, p.181–185, 2008.

LISTA, G.; CASTOLDI, F.; COMPAGNONI, G.; et al. Neonatal and maternal concentrations of hydroxyl radical and total antioxidant system: protective role of placenta against fetal oxidative stress. **Neuroendocrinology Letters**, v.31, p.319–324, 2010.

MALEK, A.; SAGER, R.; SCHNEIDER, H. Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants. **Placenta**, v.22 (Suppl. A), p.S45–S50, 2001.

MACDONALD, J.; GALLEY, H.F.; WEBESTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v.90, p.221-232, 2003.

MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83–104, 2000.

MAUGHAN, R.J. Role of micronutrients in sport and physical activity. **British Medical Bulletin**, v.55, p.683–690, 1999.

McKENZIE, H.C.; FURR, M.O. Equine neonatal sepsis: The pathophysiology of severe inflammation and infection. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians - Equine Edition**, v.3, n.7, p.661-672, 2001.

MUTINATI, M.; PANTALEO, M.; RONCETTI, M.; et al. Oxidative stress in neonatology. A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.7–16, 2014.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **The Journal of Physiology**, v.572, p.25–30, 2006.

NEGI, R.; PANDE, D.; KUMAR, A.; et al. In vivo oxidative DNA damage and lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress in preterm low-birth weight infants. **Journal of Tropical Pediatrics Journal of Tropical Pediatrics**, v.58, n.4, p.326-328, 2012.

NESS, R.B.; SIBAI, B.M. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.195, p.40–49, 2006.

NOGUEIRA, C.E.W.; LINS, L.A. **Neonatologia e Pediatria Equina. 2.v.** Pelotas: Editora Universitária UFPel. 2009. 174/219pp.

NOORI, M.; DONALD, A.E.; ANGELAKOPOULOU, A.; et al. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. **Circulation**, v.122, p.478-487, 2010.

PAZINATO, F.M.; NOGUEIRA, C.E.W.; SANTOS, C.A.; et al. Morphometric evaluation of placental vascular network in mares with laminitis. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.61, p.476-477, 2015.

QANUNGO, S.; SEN, A.; MUKHERJEA, M. Antioxidant status and lipid peroxidation in human feto-placental unit. **Clinica Chimica Acta**, v.285, p.1–12, 1999.

RIZZO, A.; CECI, E.; PANTALEO, M.; et al. Evaluation of blood and milk oxidative status during early postpartum of dairy cows. **Animal**, v.7, p.118–123, 2013.

ROBERTS, J.M.; TAYLOR, R.N.; MUSCI, T.J. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.161, p.1200-1204, 1989.

SGORBINI, M.; BONELLI, F.; MARMORINI, P.; et al. Maternal and neonatal evaluation of derivated reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. **Theriogenology**, v.83, p.48–51, 2015.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, v.365, p.785–799, 2005.

SIBAI, B.M. Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (nearterm) births. **Seminars in Perinatology**, v.30, p.16–19, 2006.

SIES, H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v.91, p.31S-38S, 1991.

SCHOLL, T.O.; STEIN, T.P. Oxidant damage to DNA and pregnancy outcome. **Journal of Maternal and Fetal Medicine**, v.10, p.182-185, 2001.

SKONER, J.M.; SIGMON, J.; LARCOM, L.L. Suppressed DNA repair capacity of peripheral lymphocytes in pregnant women. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.108, p.179–183, 1995.

SOFFLER, C. Oxidative Stress. **Veterinary Clinics – Equine Practice**, v.23, p.135–157, 2007.

SOUSA, F.L.P.; SASS, N.; CAMANO, L.; et al. Estudo da morfologia vascular do leito placentário na hipertensão arterial crônica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.6, p.537-542, 2008.

STEVEN, D.H. Placentation in the mare. **Journal of Reproductive and Fertility**, v.31, p.41-55, 1992.

TOESCU, V.; NUTTALL, S.L.; MARTIN, U.; et al. Oxidative stress and normal pregnancy. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v.57, p.609-613, 2002.

WANG, Y.; WALSH, S.W. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. **Placenta**, v.22, p.206-212, 2001.

WISDOM, S.J.; WILSON, R.; MCKILLOP, J.H.; et al. Antioxidant system in normal pregnancy and pregnancy induced hypertension. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.165, p.1701-1704, 1991.

WONG, D.; WILKINS, P.A.; BAIN, F.T.; et al. Neonatal encephalopathy in foals. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v.33, n.9, p.E.1-E10, 2011.

4.3 Artigo 2

Imunolocalização do Fator de Crescimento Endotelial (VEGF) e espessamento da parede vascular na placenta de éguas com laminite crônica

Luciana Araujo Lins, Fernanda Maria Pazinato, Bruna da Rosa Curcio, Cristina Gevehr Fernandes, Antônio Sérgio Varela Junior, Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Será submetido para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira

IMUNOLOCALIZAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL (VEGF) E ESPESSAMENTO DA PAREDE VASCULAR NA PLACENTA DE ÉGUAS COM LAMINITE CRÔNICA

IMMUNOLOCALIZATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND VASCULAR WALL THICKENING IN THE PLACENTA OF MARES WITH CHRONIC LAMINITIS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunolocalização de VEGF na placenta de éguas com laminite crônica, assim como o espessamento da parede dos vasos. Foi realizado um estudo de caso-controle, baseado no estudo de 12 éguas Puro Sangue Inglês, que apresentavam laminite crônica durante a gestação, sendo 12 éguas no mesmo criatório escolhidas ao acaso para formar o Grupo Controle. Os partos foram todos acompanhados e a placenta coletada para avaliação imediatamente após sua expulsão. Os fragmentos foram processados para histopatologia e corados pelo método Tricromático de Mallory para a avaliação da morfometria vascular e proliferação de tecido conjuntivo fibroso. Para a avaliação da densidade vascular, o número de vasos foi contado a partir das imagens. O VEGF foi avaliado por imunofluorescência. Neste estudo, foi possível observar que as éguas com quadro de laminite crônica apresentam aumento da luz vascular no corno grávido da placenta ($P < 0,01$) e maior proliferação vascular no corpo ($P < 0,01$) e corno grávido ($P < 0,05$). Estas éguas também apresentaram redução da luz vascular, com aumento da espessura da parede vascular caracterizado por deposição de tecido conjuntivo fibroso ($P < 0,02$) no corno não-grávido. Com relação à expressão do VEGF, houve maior intensidade no corno não-grávido no Grupo Laminite em relação ao mesmo ponto de coleta no Grupo Controle. Estes achados parecem relacionados com um mecanismo de compensação à provável hipertensão do quadro de laminite crônica.

Palavras chave: Égua, placenta, laminite, fibrose vascular, densidade vascular.

ABSTRACT

The aim of this paper was to evaluate the immunolocalization of VEGF in the placenta of mares with chronic laminitis, and vascular wall thickening. Was conducted a case-control study, based on 12 Thoroughbred mares presenting chronic laminitis during pregnancy, and twelve mares selected at random to form the control group. The labors were assisted and soon after expulsion, the placenta was collected for evaluation. The fragments were processed for histopathology and colored by Mallory trichrome method to evaluate the vascular morphometry and fibrous tissue proliferation. To evaluate vascular density, the number of vessels was counted directly from the image. VEGF was evaluated by immunofluorescence. In this study, was possible to observe that mares with chronic laminitis presented a larger vascular lumen on gravid horn of placenta ($P < 0,01$) and high vascular density on body ($P < 0,01$) and gravid horn (0,05). Regarding the expression of VEGF, there was a greater intensity in the non-pregnant horn in the Laminite Group in relation to the same point of collection in the Control Group. Those mares also present a smaller vascular lumen, with increasing thickness of the vascular wall characterized by fibrous connective tissue deposition ($P < 0,02$) on non-gravid horn. Those findings seems to be related with a compensatory mechanism due to a probably hypertensive state of laminitis.

Key-words: Mare, placenta, laminitis, vascular fibrosis, vascular density.

INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão fundamental na relação materno-fetal e deve ser considerada como um reflexo das condições nutricionais, metabólica, endócrina e vascular materna, além de ser indicativa da condição clínica e metabólica do neonato (HAY JR., 1995 JANSSON e POWELL, 2006). A insuficiência placentária resulta no comprometimento das trocas metabólicas e gasosas entre a mãe e o feto (MARCONI et al., 1999). O exame da placenta tem sido bastante estudado na égua, com base na avaliação macroscópica e o reconhecimento de lesões histopatológicas, como ferramenta auxiliar no diagnóstico de diversas alterações placentárias (HONG et al., 1993; SCHLAFER, 2004; LINS et al., 2012).

Na medicina obstétrica humana, são observados diversos achados placentários diretamente relacionados a transtornos gestacionais ou neonatais, onde se destacam como causas as síndromes hipertensivas, diabetes e preeclampsia (PAGE, 1939; DUCRAY, NAICKER e MOODLEY, 2011; VEERBEEK et al., 2014). Na medicina equina, não são reconhecidas estas alterações. No entanto, síndromes hipertensivas nos equinos podem ocorrer em alguns casos, como problemas cardiovasculares, digestórios (PARRY, 1984) ou a presença de laminite crônica (GAY et al., 1977; PARRY, 1984). Correa et al (2008) e Ducray, Naicker e Moodley (2011) encontraram grande deposição de material fibroso ao redor nos vilos e, no interior dos mesmos em casos mais graves, na placenta de mulheres com preeclampsia. Para Correa et al. (2008), o aumento deste tecido fibroso está presente em todas as síndromes hipertensivas. Pazinato et al. (2017) demonstraram que existe espessamento vascular na placenta de éguas com laminite e hipertensão. Trollmann et al. (2003) descrevem em humanos a ocorrência de proliferação vascular na placenta em resposta à situações de hipóxia. A hipóxia placentária pode induzir angiogênese e hiper-capilarização placentária também em humanos (TORRY, HINRICHS e TORRY, 2004; MYATT, 2006). A proliferação vascular em resposta à insuficiência placentária também é descrita em ovelhas (CARR et al., 2016). A resposta vascular à hipóxia é frequentemente estudada com base em fatores de crescimento, onde o VEGF possui papel importante na proliferação vascular placentária (FERRARA, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunolocalização de VEGF na placenta de éguas com laminite crônica, assim como a proliferação de tecido fibroso na parede dos vasos.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos casos: Para a realização deste estudo, foram utilizadas 24 éguas Puro Sangue Inglês provenientes de criatórios no município de Bagé-RS. Foi realizado um estudo de caso-controle, baseado no estudo de 12 éguas que apresentavam laminite crônica durante a gestação estudada. Estas formaram o Grupo Laminite. O diagnóstico foi definido pela presença de claudicação > 2 na escala de 1 a 5, segundo Obel (1948), além da apresentação de dor crônica,

deformidades de casco, com linhas de crescimento evidentes, e rotação da terceira falange superior a cinco graus no exame radiográfico.

Doze éguas clinicamente sadias foram selecionadas ao acaso para formar o Grupo Controle. A idade das éguas variou de 4-17 anos.

Coleta de amostras: Os partos foram todos acompanhados para a presença de qualquer alteração ocorrida durante o mesmo ou comprometimento da viabilidade dos neonatos. Imediatamente após a expulsão das membranas placentárias, foi realizada a pesagem e inspeção das mesmas, a fim de identificar processos macroscópicos de lesão. Para esta avaliação, as placentas foram dispostas em formato de “F”, como descrito por Schlafer (2004), sendo avaliadas ambas as faces placentárias, coriônica e alantoideana, em busca de alterações de coloração, presença de exsudato, espessamento ou ausência de vilosidades na face coriônica. Posteriormente, fragmentos de 3x3 cm foram colhidos do alantocórion nas regiões de corpo uterino, corno gravídico e corno não-gravídico, sendo estes acondicionados em tubos falcon de 50ml contendo formalina a 10% para fixação, durante 24 horas.

Processamento das amostras: Após a fixação em formalina, os fragmentos foram clivados e processados e incluídos em parafina, sendo seccionados em micrótomo para a produção de cortes de 3-5 μ m. Os cortes foram montados sobre lâminas de microscopia e, após, desparafinizados e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina para avaliação histopatológica. Nesta avaliação foram pesquisados sinais de inflamação, alterações degenerativas, comprometimento vascular ou qualquer informação indicativa de lesão. Para avaliação do espessamento vascular e deposição de tecido conjuntivo fibroso, as lâminas foram coradas pelo método Tricrômico de Mallory.

Avaliação da densidade vascular: Foram considerados os vasos microcotiledonários para a avaliação da densidade vascular como descrito anteriormente por Fu et al. (2013). Foram obtidas 50 imagens de cada porção da placenta (média de 7,6), totalizando 150 imagens do Grupo Controle e 150 do Grupo Laminite. Os campos foram selecionados em aumento de 20x para identificação de hot spots, ou áreas com maior volume vascular. Após a identificação dos hot spots, as lâminas foram observadas em microscopia optica em aumento de 100x para

identificação dos vasos microcotiledonários. O número de vasos foi contado a partir das imagens. A densidade vascular foi expressa em vasos/mm².

Avaliação da morfometria vascular: Para esta avaliação foram utilizadas cortes corados pelo método de Mallory. Em cada uma das lâminas, foram capturadas imagens fotográficas de arteríolas, em campos aleatórios, considerando aquelas localizadas na lâmina própria da região de transição do alantocóron. Foram obtidas imagens de 100 vasos por porção da placenta (média de 7,4), considerando corpo, corno grávido e corno não-grávido em cada grupo, totalizando 300 vasos no Grupo Controle e 300 no Grupo Laminite. As imagens foram capturadas e processadas com auxílio do software ImageJ 1.48r. Inicialmente, cada imagem teve o total de pixels calibrados para μm .

Foram realizadas medidas, através do plug-in "Straigth", do diâmetro vascular total compreendendo luz e parede vascular, diâmetro da luz e a diferença do diâmetro total pelo diâmetro da luz, resultando na espessura de parede vascular. Este método foi descrito por Pazinato et al. (2017). A relação do diâmetro da luz com o diâmetro total do vaso foi obtida através de percentual.

Avaliação deposição de tecido conjuntivo fibroso: Para esta avaliação foram consideradas as arteríolas da zona de transição do alantocóron, utilizando a coloração de Mallory. Nesta coloração, ocorre a marcação do tecido conjuntivo fibroso em azul. Foram capturadas imagens de 5 campos aleatórios de cada porção da placenta (corpo, corno grávido e corno não-grávido), sendo totalizados 10 vasos de cada uma destas porções para avaliação. Os vasos foram isolados da imagem e excluída a área da luz e também o fundo da imagem, restando apenas a parede vascular. Cada um dos vasos foi processado para a realização da quantificação de pixels através do método "Color Threshold", no qual realizou-se o ajuste à amplitude de cores da escala RGB, que permitisse selecionar toda a área vascular, excluindo-se a luz e fundo da imagem. Posteriormente, utilizando o mesmo método e mesma escala de cores, foi isolada apenas a área da parede vascular corada em azul, correspondente a deposição de tecido fibroso. Para avaliar o percentual de área que o tecido conjuntivo fibroso ocupa na parede de cada vaso, foi realizada subtração da área isolada em azul, daquela correspondente à área total do vaso e, após esta ser contabilizada, foi determinado o valor percentual que esta área ocupa na área total.

Avaliação do VEGF: Para a imunofluorescência foram obtidos cortes de 5-7µm montados sobre lâminas impregnadas de organossilano a 3% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) diluído em etanol. Os cortes foram desparafinizados com xilol e reidratados com gradiente decrescente de álcoois (100%, 95% e 85%). Foi então realizado o bloqueio de reações inespecíficas, através de kit (Protein Block, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo Human VEGF Mab (Monoclonal Mouse IgG2B Clone 26503, ReDSystems). Para a validação do teste, cada lâmina processada recebeu um corte adicional utilizado como controle negativo, afim de testar a autofluorescência do tecido. Cada controle negativo foi processado da mesma maneira que o corte teste, exceto pela ausência do anticorpo primário.

A diluição de ambos os anticorpos foi realizada em solução BSA a 1,5%. Após, as lâminas foram incubadas overnight em câmara úmida a 4°C. Após incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com solução tampão PBS e então adicionado o anticorpo fluorescente Alexa Fluor 546 anti-mouse [Goat Anti-mouse (IgG HeL) Alexa Fluor 546] 1:300. Os cortes foram então incubados por 2h em câmara úmida em sala escura e, após, adicionado sonda fluorescente para cromógeno nuclear através de cromógeno Bisbenzimidida H (Hoescht 43332 – ab145597, Abcam) a 2% e incubadas por 30min em temperatura ambiente (25°C) em sala escura. Após, as lâminas foram montadas em lamínulas com meio de montagem Fluoroshield (ab104135, Abcam) e armazenadas sob refrigeração a 4°C até momento da leitura. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo técnico. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência espectral Confocal (Leica – TCS SP8). Todas as seções de controle foram negativas, demonstrando a especificidade dos anticorpos empregados.

A leitura de quantificação da imunomarcção foi realizada a partir de histograma, através do software ImageJ®. As imagens foram inicialmente convertidas em escala RGB e mensuradas através de histograma, considerando a quantificação de pixels em escala de 0 (menor quantidade de pixels) a 255 (maior quantidade de pixels). Foi considerado o valor da moda da intensidade da imunomarcção, como descrito por Moreira et al. (2014).

Para esta análise, foram considerados o corpo, corno grávido e corno não-grávido da placenta. Foram obtidas no total 50 imagens de cada porção da placenta (média de 9,8) avaliada em cada grupo. Para a captura das imagens, foram

desconsideradas áreas que apresentaram acúmulo de hemácias, devido à intensa coloração destas células.

Processamento das imagens: Após a coloração, as lâminas foram digitalizadas utilizando microscópio Olympus BX51 (Olympus America, Center Valley, PA), com câmera digital de alta resolução Nikon SD (Nikon, USA, Melville, NY) acoplada.

Análise estatística: A análise estatística foi realizada com o software Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Foi testada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis paramétricas (diâmetro de luz vascular, relação percentual da luz com o diâmetro do vaso, percentual de colágeno, diâmetro total do vaso no corno grávido e corpo e parede vascular no corno grávido, densidade vascular do corno grávido e corno não-grávido, quantificação do VEGF entre os grupos e entre os pontos de coleta) foram analisadas pelo método de Tukey para comparação entre médias. As variáveis não-paramétricas (parede vascular do corpo e corno não-grávido e diâmetro vascular total no corno não grávido, densidade vascular do corpo uterino) foram testadas pelo método de Kruskal-Wallis. Para comparação entre diâmetro total do vaso, diâmetro de luz vascular, espessura de parede vascular, relação da luz com o diâmetro do vaso e percentual de colágeno no corpo, corno gravídico e corno não-gravídico dentro dos grupos foi utilizado teste de correlação de Pearson. As diferenças entre as médias que apresentaram valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Todos os partos avaliados no estudo foram eutócicos e os potros neonatos viáveis e ativos. A avaliação das éguas revelou que não houve diferença de idade entre os grupos ($P > 0,1$), sendo a média de idade de $8,41 \pm 1,02$ para o Grupo Controle e $10,63 \pm 1,07$ para o Grupo Laminite. O número de partos foi semelhante entre os grupos ($P > 0,6$), apresentando média de $4,33 \pm 0,77$ para o Grupo Controle e $4,90 \pm 0,81$ para o Grupo Laminite. O tempo de gestação foi significativamente mais curto ($P < 0,01$) no Grupo Laminite, com média de $336,55 \pm 3,24$ dias, em relação ao Grupo Controle, com média de $351,17 \pm 3,11$ dias. A placenta foi mais leve no Grupo

Laminite, pesando $6,04 \pm 0,32$ Kg, enquanto que a média de peso no Grupo Controle foi de $7,05 \pm 0,30$ Kg ($P < 0,04$).

Na avaliação macroscópica da placenta, não foram observadas lesões das membranas placentárias. As faces coriônica e alantoidea em todas as porções estavam integras, sem presença de exsudatos ou sinais de edema. A face coriônica apresentou aspecto aveludado e coloração vermelha viva, característico da presença das microvilosidades. Áreas de ausência de vilosidades, determinadas por perda neste padrão, não foram observadas. Histologicamente foi observada fibrose em microcotilédones, com proliferação de tecido conjuntivo com arranjos circulares, em uma (1/12) égua do Grupo Laminite, apenas (Figura 1). No leito vascular observou-se espessamento vascular na placenta das éguas com laminite (Figura 2), entretanto, não foram observadas outras alterações vasculares sugestivas de aterosose ou arteriosclerose, como presença de infartos e coágulos em capilares dos vilos.

A Tabela 1 expressa as médias obtidas dos achados de morfometria vascular e deposição de tecido conjuntivo na parede vascular nas diferentes porções da placenta e em comparação entre os dois grupos.

O VEGF foi observado nas células trofoblásticas dos microvilos e região areolar, além de parede e endotélio vascular (Figura 3). Entre as porções, sem considerar os grupos, as médias da moda de intensidade de fluorescência para VEGF foram $46,92 \pm 4,68$ no corno não-grávido e $27,52 \pm 4,68$ no corpo ($P < 0,01$). No grupo controle as médias para cada porção foram de $28,60 \pm 6,19$ no corpo uterino e $39,20 \pm 6,72$ no corno não-grávido ($P > 0,1$). Já no grupo laminite, as médias foram $26,45 \pm 6,19$ no corpo uterino e $54,65 \pm 6,72$ no corno não-grávido ($P < 0,01$). Estes dados estão apresentados na Tabela 2.

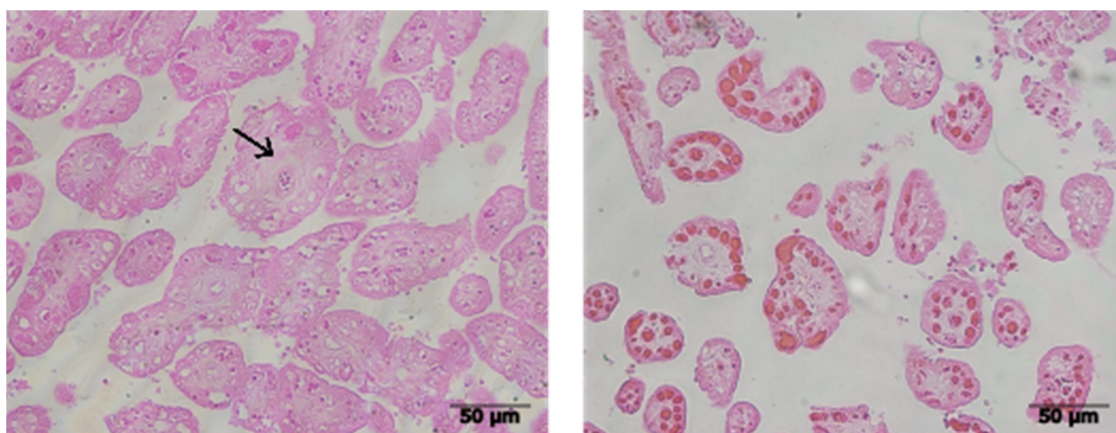


Figura 1. Avaliação histológica corada com HE da região microcotiledonária da placenta de éguas com laminite crônica (E) e do grupo controle (D). Área de fibrose (seta) em microcotilédone com arranjo circular em microcotilédone no grupo laminite.

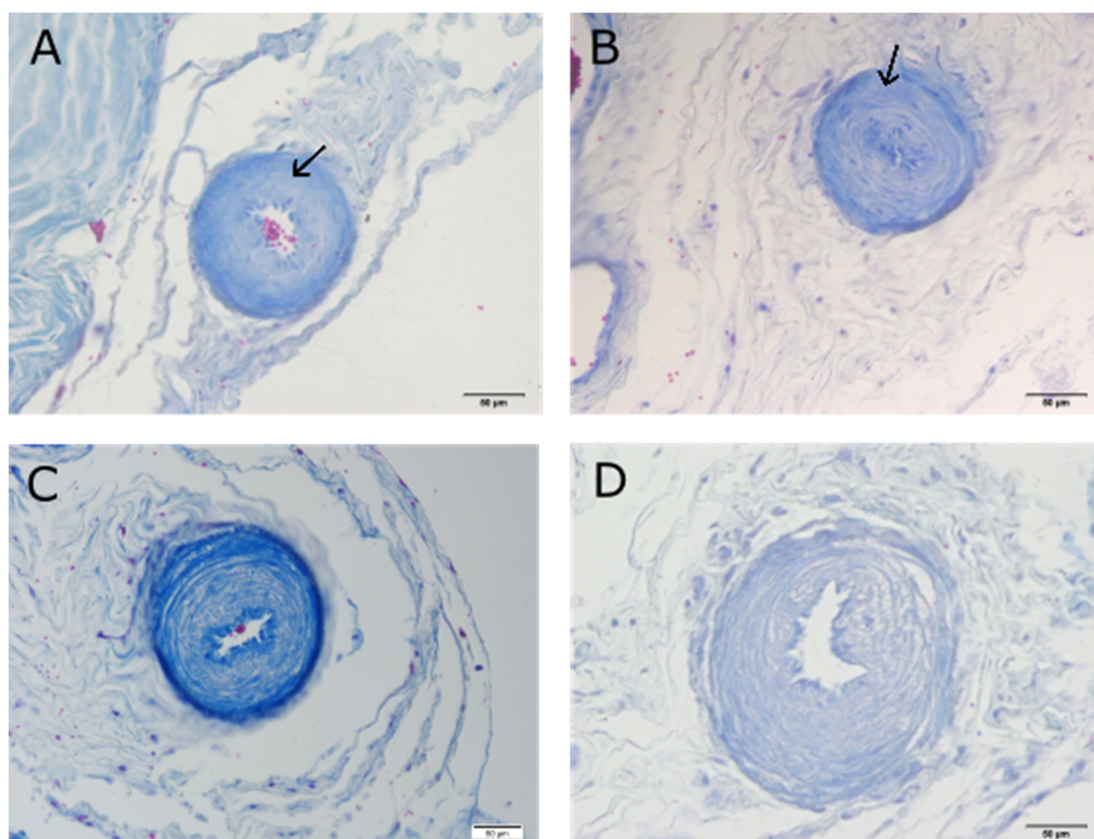


Figura 2. Arteríolas da zona de transição do alantocóron da placenta de éguas do grupo laminite (A e B) e grupo controle (C e D), corados com Mallory. As setas indicam deposição de tecido conjuntivo fibroso na parede vascular, caracterizado por desorganização da camada média.

Tabela 1. Médias \pm erro padrão da média do diâmetro vascular total, diâmetro de luz vascular, espessura de parede vascular, relação da luz com o diâmetro vascular e percentual de deposição de tecido conjuntivo na parede dos vasos de placenta de éguas PSI a termo.

		Corpo uterino	Corno grávido	Corno não-grávido
Diâmetro vascular total (μm)	GC	107.78 \pm 51.24 ^a	106.79 \pm 61.53 ^a	102.88 \pm 65.32 ^a
	GL	81.20 \pm 62.08 ^b	107.57 \pm 73.85 ^a	91.55 \pm 92.49 ^a
Diâmetro da luz vascular (μm)	GC	27.76 \pm 18.91 ^a	17.99 \pm 13.63 ^a	24.81 \pm 18.52 ^a
	GL	18.54 \pm 11.08 ^b	24.24 \pm 19.57 ^b	16.99 \pm 15.27 ^b
Espessura da parede vascular (μm)	GC	80.03 \pm 42.51 ^a	88.80 \pm 56.35 ^a	78.071 \pm 58.19 ^a
	GL	62.66 \pm 58.56 ^b	83.33 \pm 64.91 ^a	74.56 \pm 87.46 ^a
Relação da luz com o diâmetro vascular (%)	GC	26.26 \pm 13.00 ^a	19.03 \pm 11.39 ^a	26.69 \pm 14.52 ^a
	GL	25.81 \pm 11.38 ^a	24.84 \pm 13.49 ^b	22.02 \pm 13.16 ^b
Percentual de deposição de tecido conjuntivo (%)	GC	22.78 \pm 9.78 ^a	23.63 \pm 10.36 ^a	18.74 \pm 8.61 ^a
	GL	22.52 \pm 10.72 ^a	23.52 \pm 10.28 ^a	21.98 \pm 9.42 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diferentes nas linhas demonstram diferença estatística entre os grupos, relacionando os pontos de coleta (nível de 5%).

GC: Grupo Controle. GL: Grupo Laminite

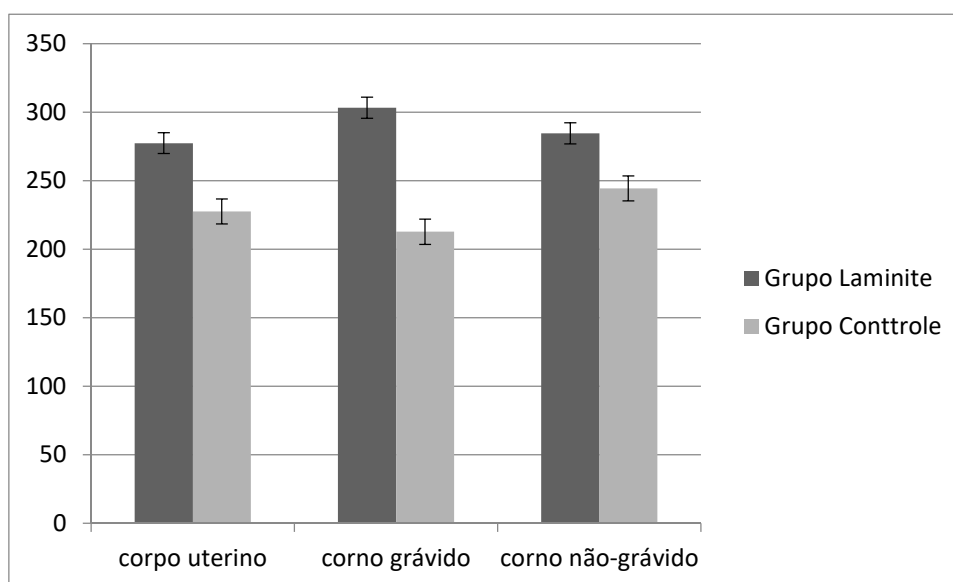


Figura 3 - Médias e desvio-padrão da densidade vascular placentária, determinada em vaso/mm², no corpo uterino, corno grávido e corno não-grávido, em comparação do Grupo Laminite com o Grupo Controle.

Tabela 2. Médias e desvio padrão da moda dos valores observados de quantificação de fluorescência para VEGF em placentas de éguas com laminite e no Grupo Controle.

Grupo	Corpo uterino	P	Corno não-grávido	P	Corno Grávido	P
Controle	26,12±5,30 ^a	> 0.6	39,52±5,79 ^a	< 0.02	31,12±7,49 ^a	>0,9
Laminite	28,84±5,30 ^a		55,08±5,79 ^b		30,96±7,49 ^a	

^{ab} Letras minúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre os grupos, em cada ponto de coleta (nível de 5%).

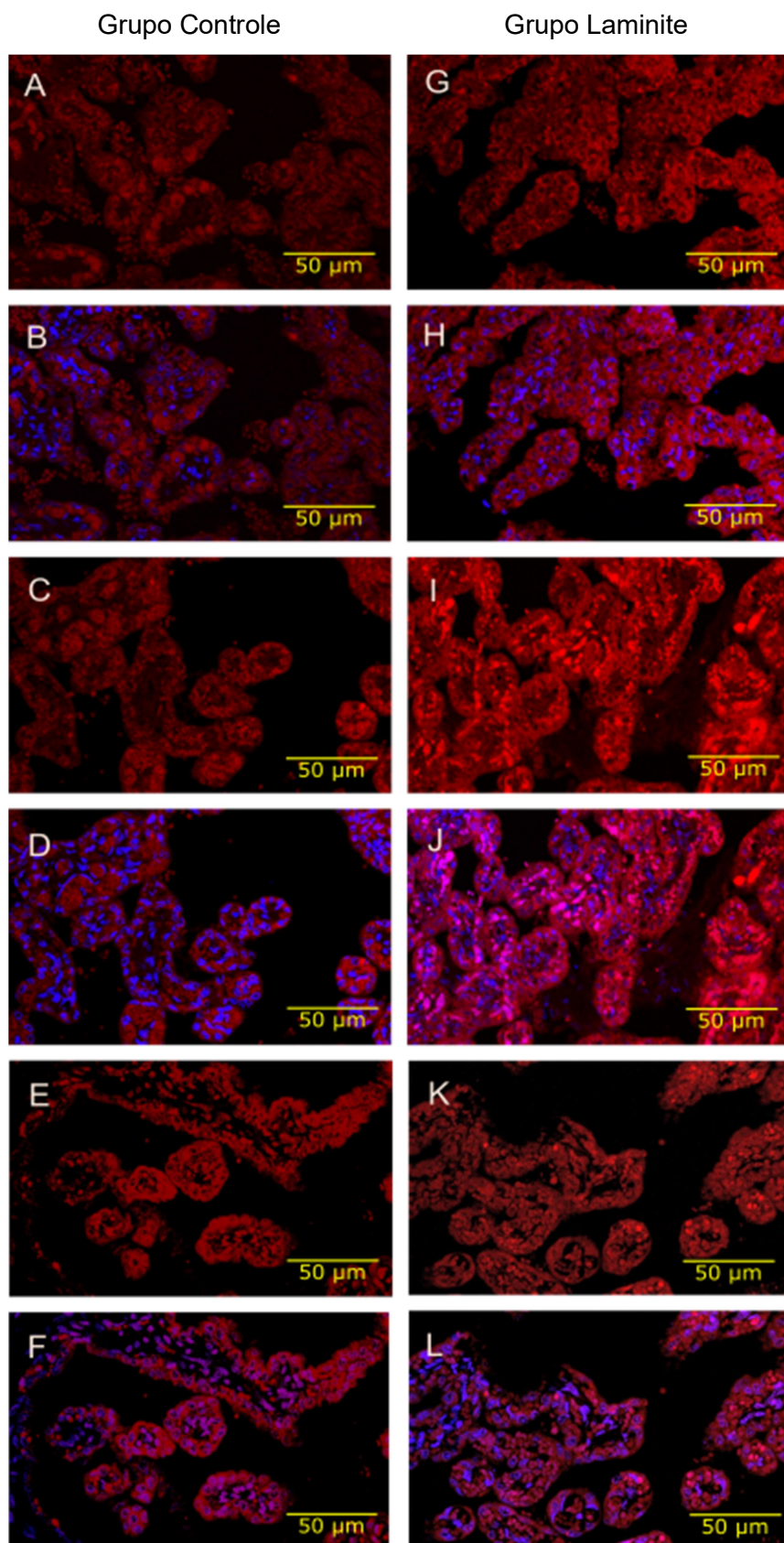


Figura 4. Imunomarcção do VEGF na placenta de éguas do Grupo Controle (A-F) e do Grupo Laminite (G-L). Marcação do VEGF, em vermelho, no corpo da placenta (A e G), corno não-grávido (C e I) e corno grávido (E e K). Marcação dos núcleos, em azul, no corpo da placenta (B e H), corno não-grávido (D e J) e corno grávido (E e K).

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram observadas alterações morfométricas nos vasos arteriais da placenta de éguas com laminite crônica, além de deposição de tecido conjuntivo fibroso na parede dos vasos do corno não-grávido e modificações na densidade vascular. Foi observado aumento da deposição de tecido conjuntivo fibroso na parede vascular no corno não grávido da placenta de éguas com laminite crônica e proliferação vascular no corpo uterino, corno grávido e corno não-grávido do mesmo grupo.

Em éguas, é descrita a dilatação progressiva dos capilares sinusóides placentários conforme avança a gestação. Esta dilatação permite uma expansão da superfície endotelial para a absorção, assim como tornar o fluxo local mais lento. Este fenômeno não parece alterar as trocas gasosas, mas pode influenciar o transporte de solutos (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Como a laminite é relacionada com hipertensão em éguas (EADES, HOLM e MOORE, 2002; PAZINATO et al., 2017), o maior diâmetro da luz vascular no corno grávido e maior diâmetro vascular total nos vasos arteriais da mesma porção e do corpo uterino, podem indicar um mecanismo compensatório da placenta em tornar mais lento o fluxo sanguíneo, facilitando as trocas materno-fetais. Para Ginter (1998), estas duas porções da placenta representam a principal interface de trocas maternas na placenta da égua, o que pode demonstrar porque esta resposta foi evidenciada apenas no corpo e corno grávido.

Gay et al. (1977) sugerem que a hipertensão, no caso da laminite crônica, ocorre associada ao quadro de dor, sendo, em alguns casos, mediado pela liberação de epinefrina. Eades, Holm e Moore (2002) descrevem que a laminite é responsável pelo aumento da produção ou liberação de mediadores vasoativos, principalmente endotelina-1. Este peptídeo induz vasoconstrição prolongada em artérias e arteríolas, levando a produção de um ambiente isquêmico (EADES, HOLM e MOORE, 2002). Esta deprivação de oxigênio por vasoconstrição regional é descrita na placenta de mulheres hipertensas, onde existe uma compensação através de modificações estruturais, como aumento da área de vilosidades ou, alternativamente, podem ocorrer danos, como a deposição de tecido conjuntivo fibroso (DUCRAY, NAICKER e MOODLEY et al., 2011). Em mulheres com preeclampsia ou outras síndromes hipertensivas, processos de fibrose vascular

placentária podem representar um processo reparativo em resposta a infarto ou inflamação (DUCRAY, NAICKER e MOODLEY, 2011). No presente estudo, avaliando a placenta de éguas com laminite, entretanto, não foram observadas lesões vasculares, como infarto ou processo inflamatório.

O corno não-grávido da placenta, apesar de não conter partes fetais, participa ativamente das trocas materno-fetais, principalmente no final da gestação. Esta porção possui vascularização importante para o desenvolvimento fetal, além de não sofrer estiramento como o corpo uterino e porção caudal do corno grávido. Este estiramento pode reduzir o número de trocas por área (GUINTER, 1998). No corno não-grávido das éguas com laminite crônica, os vasos apresentaram menor luz e maior espessura da parede dos vasos arteriais, com deposição de tecido conjuntivo fibroso. Este achado parece representar uma adaptação da placenta ao quadro hipertensivo da laminite crônica, ficando restrito ao corno não-grávido, que possui a menor interface de trocas materno-fetais. Entretanto, Guinter (1998) descreve a participação fundamental desta porção no desenvolvimento fetal e progressão da gestação. Nossos dados demonstraram um menor tempo de gestação nas éguas com laminite crônica e que apresentaram fibrose na parede dos vasos arteriais do corno não-grávido da placenta, o que pode demonstrar uma insuficiência placentária.

Na placenta de humanos com restrição no desenvolvimento fetal foi observado hipovascularização da placenta em áreas distantes do cordão umbilical. Entretanto, não é descrito se este dado é causa ou consequência do distúrbio (JUNAID et al., 2014). A insuficiência placentária em ovelhas também é compensada por um aumento na proliferação vascular nas áreas de maior troca materno-fetal (CARR et al., 2016). A placenta de éguas com laminite apresentaram maior densidade vascular no corpo, corno grávido e corno não-grávido, o que pode representar que houve uma mobilização maior do fluxo para sanguíneo para todas as porções da placenta, sugerindo que os animais deste grupo compensaram prováveis falhas na irrigação placentária.

Com relação à quantificação do VEGF, houve maior intensidade no corno não-grávido em relação ao corpo uterino no Grupo Laminite, assim como em relação ao mesmo ponto de coleta no Grupo Controle. Como é descrito que a hipóxia é um dos fatores que modulam a expressão do VEGF (FERRARA, 2004), a maior intensidade desta proteína no Grupo Laminite pode representar uma adaptação da

placenta à hipoxigenação. É descrito esta resposta adaptativa à insuficiência placentária em outras espécies, como humanos (TROLLMANN et al., 2003), ovelhas (CARR et al., 2016), com aumento da expressão de VEGF.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível observar que as éguas com quadro de laminite crônica apresentam aumento da luz vascular no corno grávido da placenta e maior proliferação vascular no corpo e corno grávido. Estas éguas também apresentaram redução da luz vascular, com aumento da espessura da parede vascular caracterizado por deposição de tecido conjuntivo fibroso no corno não-grávido. A expressão do VEGF foi mais intensa no corno não-grávido das éguas com laminite. Estes achados podem estar relacionados com um mecanismo de compensação à hipertensão do quadro de laminite crônica.

REFERÊNCIAS

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.

CARR, D.J.; DAVID, A.L.; AITKEN, R.P.; MILNE, J.S.; BOROWICZ, P.P.; WALLACE, J.M.; REDMER, D.A. Placental vascularity and markers of angiogenesis in relation to prenatal growth status in overnourished adolescent ewes. **Placenta**, v.46, p.79-86, 2016.

CORREA, R.R.; GILIO, D.B.; CAVELLANI, C.L.; PASCHOINI, M.C.; OLIVEIRA, F.A.; PERES, L.C.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.; CASTRO, E.C. Placental morphometrical and histopathology changes in the diferente clinical presentations of hypertensive syndromes in pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.277, n.3, p.201–206, 2008.

DUCRAY, J.F.; 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 e Gynecology and Reproductive Biology**, v.156, p.29–34, 2011.

EADES, S.C.; HOLM, A.M.S.; MOORE, R.M. A review of the pathophysiology and treatment of acute laminitis: Pathophysiologic and therapeutic implications of endothelin-1. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.48, p.353-361, 2002.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v.25, n.4, p.581–611, 2004.

FU, G.; CHE, X.; SUN, Y.; HUANG, X.; XU, H.; ZHOU, C.; ZHANG, X. Pigment epithelial-derived factor expression in endometriotic lesions in a rat model of endometriosis. **Acta Histochemica**, v.115, p.301–307, 2013.

GAY, C.C.; CARTER, J.; MCCARTHY, M.; MASON, T.A.; CHRISTIE, B.A.; REYNOLDS, W.T.; SMYTH, B. The value of arterial blood pressure measurement in assessing the prognosis in equine colic. **Equine Veterinary Journal**, v.9, p.202-204, 1977.

GUINTER, O.J. Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.44, p.73-104, 1998.

HAY JR., W.W. Current topic: Metabolic interrelationships of placenta and fetus. **Placenta**, v.16, p.19-30, 1995.

HONG, C.B.; DONAHUE, J.M.; GILES JR., R.C.; PETRITES-MURPHY, M.B.; POONACHA, K.B.; ROBERTS, A.W.; SMITH, B.J.; TRAMONTIN, R.R.; TUTTLE, P.A.; SWERCZEK, T.W. Etiology and pathology of equine placentitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.56-63, 1993.

JANSSON, T. POWELL, T.L. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? A review. **Placenta**, v.27(A), p.91-97, 2006.

JUNAID, T.O.; BROWNBILL, P.; CHALMERS, N.; JOHNSTONE, E.D.; APLIN, J.D. Fetoplacental vascular alterations associated with fetal growth restriction. **Placenta**, v.35, p.808-815, 2014.

LINS, L.A.; FINGER, I.S.; FERNANDES, C.G.; CURCIO, B.R.; CORREA, M.N.; NOGUEIRA, C.E.W. Resposta Clínica e metabólica de potros neonatos em relação aos achados histopatológicos da placenta na égua. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.1436-1441, 2012.

MARCONI, A.M.; PAOLINI, C.L.; STRAMARE, L.; CETIN, I.; FENNESSEY, P.V.; PARDI, G.; BATTAGLIA, F.C. Steady state maternal-fetal leucine enrichments in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. **Pediatric Research**, v.46, p.114-119, 1999.

MOREIRA, F.; GHELLER, S.M.M.; MONDADORI, R.G.; VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; LUCIA JUNIOR, T. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus, uterus and ovaries of swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.1074–1078, 2014.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **The Journal of Physiology**, v.572, n.1, p.25–30, 2006.

OBEL, N. **Studies on the histopathology of acute laminitis**. Stockholm: Veterinary Stockholm. 1-50, 1984.

PAGE, E.W. The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.37, p.291-293, 1939.

PARRY, B.W. Resting blood pressure values in various equine clinical cases. **Equine Veterinary Science**, v.4, n.2, p:49-56, 1984.

PAZINATO, F.M.; CURCIO, B.R.; FERNANDES, C.G.; SANTOS, C.A; FEIJO, L.S.; VARELA JR., A.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Histomorphometry of the placental vasculature and microcotyledons in Thoroughbred mares with chronic laminitis. **Theriogenology**, v.91, p.77-81, 2017.

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

TORRY, D.S.; HINRICHS, M.; TORRY, R.J. Determinants of placental vascularity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.51, p.257-268, 2004.

TROLLMANN, R.; AMANN, K.; SCHOOF, E.; SCHOOF, E.; BEINDER, E.; WENZEL, D.; RASCHER, W.; DÖTSCH, J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v.188, n.2, p.517-523, 2003.

VEERBEEK, J.H.W.; NIKKELS, P.G.J.; TORRANCE, H.L.; GRAVESTIEN, J.; POST UITERWEER, E.D.; DERKS, J.B.; KOENEN, S.V.; VISSER, G.H.A.; VAN RIJN, B.B.; FRANX, A. Placental pathology in early intrauterine growth restriction associated with maternal hypertension. **Placenta**, v.35, p.696-701, 2014.

7 Considerações finais

Foi evidenciado, através de revisão de literatura, que a égua pode apresentar achados de insuficiência placentária tardios, semelhante aos encontrados em mulheres com preeclampsia, sendo que essas alterações podem estar associadas ao estresse oxidativo durante a gestação. Estes achados, entretanto, não parecem ter relação com a instalação de dano oxidativo nos potro neonatos.

O fator de crescimento endotelial (VEGF) apresenta imunolocalização na placenta da égua nas células trofoblásticas dos microvilos e região areolar, além de parede e endotélio vascular. Este fator apresentou maior marcação na placenta de éguas com laminite crônica, na porção do corno não-grávido.

Foi possível observar que as éguas com quadro de laminite crônica apresentam aumento da luz vascular no corno grávido da placenta e maior proliferação vascular no corpo e corno grávido. Estas éguas também apresentaram redução da luz vascular, com aumento da espessura da parede vascular caracterizado por deposição de tecido conjuntivo fibroso no corno não-grávido. Estes achados parecem relacionados com um mecanismo de compensação à provável hipertensão do quadro de laminite crônica.

Referências

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.

ALBERTS, B.; BRADY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Membrane transport of small molecules. In: ALBERTS, B.; BRADY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. Nova lorque: Garland, 2003. p.286-314.

AHMAD, S.; AHMED, A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. **Circulation Research**, v.95, p.884-891, 2004.

ALLEN, W.R.; HAMILTON, D.W.; MOOR, R.M. The origin of the equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. **The Anatomical Record**, v.177, p.485-502, 1973.

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.121, p.513-527, 2001.

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.

ALLEN, W.R.; WILSHER, S. A Review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v.30, p.1005-1015, 2009.

AL-ZI'ABI, M.O.; WATSON, E.D.; FRASER, H.M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v.125, p.259-270, 2003.

AMAL, M.A.E.; FAWZIA, Y.H.S; FATEN, I.G. Antioxidents markers, trace minerals and steroid hormones in preconceptional arab mares. **Global Veterinaria**, v.9, n.3, p.311-318, 2012.

AYDEMIR, T.; OZTURK, R.; BOZKAYA, L.A.; TARHAN, L. Effect of antioxidant vitamins A, C, E and trace elements Cu, Se on CuZnSOD, GSHPx, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v.18, p.109-115, 2000.

BAST, A.; HAENEN, G.R. Lipoic acid: A multifunctional antioxidant. **Biofactors**, v.17, p.207–213, 2003.

BAYHAN, G.; KOCYIGIT, Y.; ATAMER, A.; ATAMER, Y.; AKKUS, Z. Potential atherogenic roles of lipids, lipoprotein(a) and lipid peroxidation in preeclampsia. **Gynecological Endocrinology**, v.21, p.1–6, 2005.

BOROWICZ, P.P.; ARNOLD, D.R.; JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.D.; REYNOLDS, L.P. Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: Vascular development and angiogenic factor expression. **Biology of Reproduction**, v.76, p.259–267, 2007.

BUCCA, S. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. **Veterinary Clinics - Equine Practice**, v.22, p.749–761, 2006.

BURTON, G.J.; HEMPSTOCK, J.; JAUNIAUX, E. Oxygen, Early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. **Reproductive Biomedicine Online**, v.6, p.84–96, 2003.

CALVERT, J.W.; ZHANG, J.H. Pathophysiology of a hypoxic-ischemic insult during the perinatal period. **Neurology Research**, v.27, n.3, p.246-260, 2005.

CANCELIER, A.C.; PETRONILHO, F.; REINKE, A.; CONSTANTINO, L.; MACHADO, R.; RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: A case-control study. **Pediatric Critical Care Medicine**, v.10, n.4, p.467-471, 2009.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V.; BENEDITO, J.L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Veterinary Journal*, v.169, p.286–292, 2005.

CARR, D.J.; DAVID, A.L.; AITKEN, R.P.; MILNE, J.S.; BOROWICZ, P.P.; WALLACE, J.M.; REDMER, D.A. Placental vascularity and markers of angiogenesis in relation to prenatal growth status in overnourished adolescent ewes. **Placenta**, v.46, p.79-86, 2016.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, v.49, p.481–493, 1993.

CHEUNG, C.Y. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v.4, p.169–177, 1997.

COMLINE, R.S.; SILVER, M. PO₂, PCO₂ and PH levels in the umbilical and uterine blood of the mare and ewe. **Journal of Physiology**, v.209, p.587–609, 1970.

CORREA, R.R.; GILIO, D.B.; CAVELLANI, C.L.; PASCHOINI, M.C.; OLIVEIRA, F.A.; PERES, L.C.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.; CASTRO, E.C. Placental morphometrical and histopathology changes in the different clinical presentations of hypertensive syndromes in pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.277, n.3, p.201–206, 2008.

DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research**, v.3, p.235-260, 1988.

DUCRAY, J.F.; 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 e Gynecology and Reproductive Biology**, n.156, p.29–34, 2011.

EADES, S.C.; HOLM, A.M.S.; MOORE, R.M. A review of the pathophysiology and treatment of acute laminitis: Pathophysiologic and therapeutic implications of endothelin-1. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.48, p.353-361, 2002.

EVANS, J.W. Effects of fasting, gestation, lactation and exercise on glucose turnover in horses. **Journal of Animal Science**, v.33, p.1001-1004, 1971.

FABER, J.J.; THORNBURG, K.L. **Placental physiology. Structure and function of fetomaternal exchange**. New York: Raven, 1983. pp. 208.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v.25, n.4, p.581–611, 2004.

FOWDEN, A.L. Pancreatic endocrine function and carbohydrate metabolism in the fetus. In: ALBRECHT, E.B.; PEPE, G. **Perinatal endocrinology**. Ithaca (NY): Perinatal Press, 1985. p.71-90.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97–112, 1995.

FU, G.; CHE, X.; SUN, Y.; HUANG, X.; XU, H.; ZHOU, C.; ZHANG, X. Pigment epithelial-derived factor expression in endometriotic lesions in a rat model of endometriosis. **Acta Histochemica**, v.115, p.301– 307, 2013.

FUJIMAKI, A.; WATANABE, K.; MORI, T.; KIMURA, C.; SHINOHARA, K.; WAKATSUKI, A. Placental oxidative DNA damage and its repair in preeclamptic women with fetal growth restriction. **Placenta**, v.32, p.367-372, 2011.

FURNESS, D.L.F.; DEKKER, B, G.A.; ROBERTS, C.T. Review - DNA damage and health in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, n. 89, p. 153–162, 2011.

FURR, M.; FRELLSTEDT, L.; GEOR, R. Sick Neonatal foals do not demonstrate evidence of oxidative stress – Short communication. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, n.5, p.297-299, 2012.

GARNER, H.E.; COFFMAN, J.R.; HAHN, A.W.; HUTCHESON, D.P.; TUMBLESON, M.E. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, p.441-444, 1975a.

GARNER, H.E.; COFFMAN, J.R.; HAHN, A.W.; ACKERMAN, N.; JOHNSON, J.H. Equine laminitis and associated hypertension: a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.166, p.56-57, 1975b.

GAY, C.C.; CARTER, J.; MCCARTHY, M.; MASON, T.A.; CHRISTIE, B.A.; REYNOLDS, W.T.; SMYTH, B. The value of arterial blood pressure measurement in assessing the prognosis in equine colic. **Equine Veterinary Journal**, v.9, p.202-204, 1977.

GERBER, H.P.; HILLAN, K.J.; RYAN, A.M.; KOWALSKI, J.; KELLER, G.A.; RANGELL, L.; WRIGHT, B.D.; RADTKE, F.; AGUET, M.; FERRARA, N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. **Development**, v.126, p.1149-159, 1999.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.117, p.143-152, 1999.

GÓRECKA, R.; KLECZKOWSKI, M.; KLUCINSKI, W.; KASZTELAN, R.; SITARSKA, E. Changes in antioxidant components in blood of mares during pregnancy and after foaling. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.46, p.301-305, 2002.

GRANGER, J.P.; ALEXANDER, B.T.; LLINAS, M.T.; BENNETT, W.A.; KHALIL, R.A. Pathophysiology of preeclampsia: Linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. **Microcirculation**, v.9, p.147–160, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; JOHNSON, M.L.; BOROWICZ, P.P.; MINTEN, M.; BILSKI, J.J.; WROBLEWSKI, R.; VELIMIROVICH, M.; COUPE, L.R.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Placental development during early pregnancy in sheep: Cell proliferation, global methylation, and angiogenesis in the fetal placenta. **Reproduction**, v.141, p.529-540, 2011.

GUINTER, O.J. Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.44, p.73-104, 1998.

GUPTA, S.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. **Obstetrical e Gynecological Survey**, v.60, p.807–816, 2005.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715–725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. Londres:Oxford University press, 1999. pp.936.

HAY Jr., W.W. Current topic: Metabolic interrelationships of placenta and fetus. **Placenta**, v.16, p:19-30, 1995.

HONG, C.B.; DONAHUE, J.M.; GILES JR., R.C.; PETRITES-MURPHY, M.B.; POONACHA, K.B.; ROBERTS, A.W.; SMITH, B.J.; TRAMONTIN, R.R.; TUTTLE, P.A.; SWERCZEK, T.W. Etiology and pathology of equine placentitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.56-63, 1993.

HUANG, H.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; MORAN, K.; LAVOIE, J-P. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology**, v.292, n.5, p.L1147-L1154, 2007.

HUBEL, C.A.; ROBERTS, J.M.; TAYLOR, N.R.; MUSCI, T.J.; ROGERS, G.M.; MCLAUGHLIN, M.K. Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.161, p.1025-1034, 1989.

HUBEL, C.A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.222–235, 1999.

IBBA-MANNESCHI, L.; MANETTI, M.; MILIA, A.F.; MINIATI, I.; BENELLI, G.; GUIDUCCI, S.; MECACCI, F.; MELLO, G.; DI LOLLO, S.; MATUCCI-CERINIC, M. Severe fibrotic changes and altered expression of angiogenic factors in maternal scleroderma: Placental findings. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.69, p.458–461, 2010.

JANSSON, T.; POWELL, T.L. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? A review. **Placenta**, v.27(A), p.91-97, 2006.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A.L.; HEMPSTOCK, J.; BAO, Y.P.; SKEPPER, J.N.; BURTON, G.J. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: A possible factor in human early pregnancy failure. **American Journal of Pathology**, v.157, p.2111–2122, 2000.

JAUNIAUX, E.; POSTON, L.; BURTON, G.J. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. **Human Reproduction Update**, v.12, p.747–755, 2006.

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.

JUNAID, T.O.; BROWNBILL, P.; CHALMERS, N.; JOHNSTONE, E.D.; APLIN, J.D. Fetoplacental vascular alterations associated with fetal growth restriction. **Placenta**, v.35, p.808-815, 2014.

KAPOOR, K.; BASU, S.; DAS, B.; BHATIA, B.D. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.52, p.372–375, 2006.

KIMURA, C.; WATANABE, K.; IWASAKI, A.; MORI, T.; MATSUSHITA, H.; SHINOHARA, K.; WAKATSUKI, A. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v.26, n.5, p.491–496, 2013.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinary Journal**, v.177, p.178-191, 2008.

KONTIC-VUCINIC, O.; TERZIC, M.; RADUNOVIC, N. The role of antioxidant vitamins in hypertensive disorders of pregnancy. **Journal of Perinatology. Medicine**, v.36, n.4, p.282–290, 2008.

KUMAR, A.; RAMAKRISHNA, S.; BASU, S.; RAO, G.R. Oxidative stress in perinatal asphyxia. **Pediatrics Neurology**, v.38, p.181–185, 2008.

LEISER, R.; KOOB, B. Structural and functional aspects of the placental microvasculature. In: MOTTA, P.M.; MURAKAMI, R.; FUJITA, H. **Scanning electron microscopy of vascular casts: methods and application**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1992. p. 262-277.

LEISER, R.; KREBS, C.; EBERT, B.; DANTZER, V. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and human. **Microscopy Research and Technique**, v.38, p.7687, 1997.

LEVIN, E.R. Endothelins. **The New England Journal of Medicine**, v.333, p.356-363, 1995.

LINS, L.A.; FINGER, I.S.; FERNANDES, C.G.; CURCIO, B.R.; CORREA M.N.; NOGUEIRA C.E.W. Resposta Clínica e metabólica de potros neonatos em relação aos achados histopatológicos da placenta na égua. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.1436-1441, 2012.

LISTA, G.; CASTOLDI, F.; COMPAGNONI, G.; MAG-GIONI, C.; CORNE´LISSEN, G.; HALBERG, F. Neonatal and maternal concentrations of hydroxyl radical and total antioxidant system: protective role of placenta against fetal oxidative stress. **Neuroendocrinology Letters**, v.31, p.319–324, 2010.

MALEK, A.; SAGER, R.; SCHNEIDER, H. Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants. **Placenta**, v.22(Suppl. A), p.S45–S50, 2001.

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.

MACDONALD, J.; GALLEY, H.F.; WEBESTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v.90, p.221-232, 2003.

McLEAN, K.J.; CROUSE, M.S.; CROSSWHITE, M.R.; NEGRIN PEREIRA, N.; DAHLEN, C.R.; BOROWICZ, P.P.; REYNOLDS, L.P.; WARD, A.K.; NEVILLE, B.W.; CATON, J.S. Impacts of maternal nutrition on uterine and placental vascularity and mRNA expression of angiogenic factors during the establishment of pregnancy in beef heifers. **Translational Animal Science**, v.1, p.160-167, 2017.

MaCPHERSON, M.L. Identification and Management of the High-Risk Pregnant Mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.53, p.293-304, 2007.

MARCONI, A.M.; PAOLINI, C.L.; STRAMARE, L.; CETIN, I.; FENNESSEY, P.V.; PARDI, G.; BATTAGLIA, F.C. Steady state maternal-fetal leucine enrichments in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. **Pediatric Research**, v.46, p.114-119, 1999.

MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83–104, 2000.

MAUGHAN, R.J. Role of micronutrients in sport and physical activity. **British Medical Bulletin**, v.55, p.683–690, 1999.

McKENZIE, H.C.; FURR, M.O. Equine neonatal sepsis: The pathophysiology of severe inflammation and infection. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians - Equine Edition**, v.3, n.7, p.661-672, 2001.

MOREIRA, F.; GHELLER, S.M.M.; MONDADORI, R.G.; VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; LUCIA JUNIOR, T. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus, uterus and ovaries of swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.1074–1078, 2014.

MORRESEY, P.R. Prenatal and perinatal indicators os neonatal viability. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, p.238-249, 2005.

MUTINATI, M.; PANTALEO, M.; RONCETTI, M.; PICCINNO, M.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R.L. Oxidative stress in neonatology. A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.7–16, 2014.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **The Journal of Physiology**, v.572, p.25–30, 2006.

NEGI, R.; PANDE, D.; KUMAR, A.; KHANNA, R.S.; KHANNA, H.D. In vivo oxidative DNA damage and lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress in preterm low-birth weight infants. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.58, n.4, p.326-328, 2012.

NESS, R.B.; SIBAI, B.M. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.195, p.40–49, 2006.

NOGUEIRA, C.E.W.; LINS, L.A. **Neonatologia e Pediatria Equina. 2.v.** Pelotas: Editora Universitária UFPel. 2009. 174/219pp.

NOORI, M.; DONALD, A.E.; ANGELAKOPOULOU, A.; HINGORANI, A.D.; WILLIAMS, D.J. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. **Circulation**, v.122, p.478-487, 2010.

OBEL, N. **Studies on the histopathology of acute laminitis.** Stockholm: Veterinary Stockholm. 1-50, 1948.

PAGE, E.W. The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.37, p.291-293, 1939.

PARRY, B.W. Resting blood pressure values in various equine clinical cases. **Equine Veterinary Science**, v.4, n.2, p.49-56, 1984.

PAZINATO, F.M.; NOGUEIRA, C.E.W.; SANTOS, C.A.; VARELA JR, A.S.; FEIJO, L.S.; FERNANDES, C.G.; CURCIO, B.R. Morphometric evaluation of placental vascular network in mares with laminitis. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.61, p.476-477, 2015.

PAZINATO, F.M.; CURCIO, B.R.; FERNANDES, C.G.; SANTOS, C.A; FEIJO, L.S.; VARELA JR., A.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Histomorphometry of the placental vasculature and microcotyledons in Thoroughbred mares with chronic laminitis. **Theriogenology**, v.91, p.77-81, 2017.

QANUNGO, S.; SEN, A.; MUKHERJEA, M. Antioxidant status and lipid peroxidation in human fetoplacental unit. **Clinica Chimica Acta**, v.285, p.1–12, 1999.

RÄTSEP, M.T.; CARMELIET, P.; ADAMS, M.A.; CROY, M.A. Impact of placental growth factor deficiency on early mouse implant site angiogenesis. **Placenta**, v.35, p.772-775, 2014.

RIZZO, A.; CECI, E.; PANTALEO, M.; MUTINATI, M.; SPEDICATO, M.; MINOIA, G.; SCIORSCI, R.L. Evaluation of blood and milk oxidative status during early postpartum of dairy cows. **Animal**, v.7, p.118–123, 2013.

ROBERTS, J.M.; TAYLOR, R.N.; MUSCI, T.J. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.161, p.1200-1204, 1989.

RUBANYI, G.M.; POLOKOFF, M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological Reviews**, v.46, p.325-415, 1994.

SAMUEL, C.H.; ALLEN, W.R.; STEVEN, D.H. Studies on the equine placenta. I. The development of microcotyledons. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.41, p.441-445, 1974.

SAMUEL, C.A.; ALLEN, W.R.; STEVEN, D.H. Ultrastructural development of the equine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, 23 (suppl), p.575-578, 1975.

SAMUEL, C.A.; ALLEN, W.R.; STEVEN, D.H. Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.433-437, 1977.

SCHOLL, T.O.; STEIN, T.P. Oxidant damage to DNA and pregnancy outcome. **Journal of Maternal and Fetal Medicine**, v.10, p.182-185, 2001.

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

SEBASTIAN, M.; BENIRSCHKE, K. Domestic Horse (*Equus caballus*). In: BENIRSCHKE, K. **Comparative Placentation**. International Veterinary Information Service - A4110.0607. Ithaca, NY. 2004.

SGAMBATI, E.; MARINI, M.; THYRION, G.D.Z.; PARRETTI, E.; MELLO, G.; ORLANDO, C.; SIMI, L.; TRICARICO, C.; GHERI, G.; BRIZZIA, E. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. **BJOG: An international journal of obstetrics e gynaecology**, v.111, p.564–570, 2004.

SGORBINI, M.; BONELLI, F.; MARMORINI, P.; BIAGI, G.; CORAZZA, M.; PASQUINI, A. Maternal and neonatal evaluation of derivated reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. **Theriogenology**, v.83, n.1, p.48–51, 2015.

SHOREA, V.H.; WANG, T.H.; WANG, C.L.; TORRYB, R.J.; CAUDLE, M.R.; TORRYASC, D.S. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. **Placenta**, v.18, p.657-665, 1997.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, v.365, p.785–799, 2005.

SIBAI, B.M. Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (nearterm) births. **Seminars in Perinatology**, v.30, p.16–19, 2006.

SIES, H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v.91, p.31S-38S, 1991.

SKONER, J.M.; SIGMON, J.; LARCOM, L.L. Suppressed DNA repair capacity of peripheral lymphocytes in pregnant women. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.108, p.179–183, 1995.

SOFFLER, C. Oxidative Stress. **Veterinary Clinics – Equine Practice**, v.23, p.135–157, 2007.

SOUSA, F.L.P.; SASS, N.; CAMANO, L.; STÁVALE, J.N.; MESQUITA, M.R.S.; SOUZA, E.V.; OLIVEIRA, F.R.; ISHIGAI, M.M.S. Estudo da morfologia vascular do leito placentário na hipertensão arterial crônica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.6, p.537-542, 2008.

STEVEN, D.H. Placentation in the mare. **Journal of Reproductive and Fertility**, v.31, p.41–55, 1992.

TAYLOR, C.M.; STEVENS, H.; ANTHONY, F.W.; WHEELER, T. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines: JEG, Jar and BeWo. **Placenta**, v.18, p.451-458, 1997.

TOESCU, V.; NUTTALL, S.L.; MARTIN, U.; KENDALL, M.J.; DUNNE, F. Oxidative stress and normal pregnancy. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v.57, p.609–613, 2002.

TORRY, D.S.; HINRICHS, M.; TORRY, R.J. Determinants of placental vascularity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.51, p.257-268, 2004.

TRIUNFO, S.; CROVETTO, F.; CRISPI, F.; RODRIGUEZ-SUREDA, V.; DOMINGUEZ, C.; NADAL, A.; PEGUERO, A.; GRATACOS, E.; FIGUERAS, F. Association of first-trimester angiogenic factors with placental histological findings in late-onset preeclampsia. **Placenta**, v.42, p.44-50, 2016.

TROLLMANN, R.; AMANN, K.; SCHOOF, E.; SCHOOF, E.; BEINDER, E.; WENZEL, D.; RASCHER, W.; DÖTSCH, J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.188, n.2, p.517-523, 2003.

VEERBEEK, J.H.W.; NIKKELS, P.G.J.; TORRANCE, H.L.; GRAVESTEIJN, J.; POST UITERWEER, E.D.; DERKS, J.B.; KOENEN, S.V.; VISSER, G.H.A.; VAN RIJN, B.B.; FRANX, A. Placental pathology in early intrauterine growth restriction associated with maternal hypertension. **Placenta**, v.35, p.696-701, 2014.

WANG, Y.; WALSH, S.W. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. **Placenta**, v.22, p.206-212, 2001.

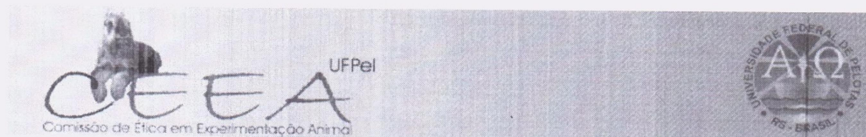
WISDOM, S.J.; WILSON, R.; MCKILLOP, J.H.; WALKER, J.J. Antioxidant system in normal pregnancy and pregnancy induced hypertension. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.165, p.1701-1704, 1991.

WONG, D.; WILKINS, P.A.; BAIN, F.T.; BROCKUS, C. Neonatal encephalopathy in foals. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v.33, n.9, p.E.1-E10, 2011.

YUAN, F.; CHEN, Y.; DELLIAN, M.; SAFABAKHSH, N.; FERRARA, N.; JAIN, R.K. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.14765–14770, 1996.

Anexos

ANEXO: Parecer da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 12 de junho de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A *CEEA* analisou o projeto intitulado: **“Avaliação do estresse oxidativo placentário na égua e respectivos potros neonatos”**, processo nº23110.003802/2015-14, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 3802-2015**).

Vigência do Projeto: 10/07/2015 a 10/07/2017

Espécie/Linhagem: Equino/Crioula/PSI

Nº de animais: 40

Idade: 20 animais de 3-15 anos e 20 animais neonatos

Sexo: Machos e fêmeas

Origem: Hospital Veterinário/Faculdade de Veterinária/UFPEL

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável: _____

Ciente em: 10/07/2015

Prof. Dr. Carlos E. W. Nogueira
 - Clínica Médica de Equinos -
 - Hospital de Clínicas Veterinárias -
 - Universidade Federal de Pelotas -