CARINA DE FÁTIMA GUIMARÃES

**Expressão de VEGF (VEGFR1/VEGFR2) e avaliação estereológica da
membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês: influência
da pluriparidade sobre o peso dos potros ao nascimento**

São Paulo

2013

CARINA DE FÁTIMA GUIMARÃES

Expressão de VEGF (VEGFR1/VEGFR2) e avaliação estereológica da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês: influência da pluriparidade sobre o peso dos potros ao nascimento

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes.

De acordo:

Orientador(a)

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2806
FMVZ

Guimarães, Carina Fátima

Expressão de VEGF (VEGFR1/VEGFR2) e avaliação estereológica da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês: influência da pluriparidade sobre o peso dos potros ao nascimento / Carina Fátima Guimarães. -- 2013.
122 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Barbosa Fernandes.

1. Equine. 2. Placenta. 3. Neonate. 4. Fetomaternal interaction. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação imunohistoquímica da expressão de VEGF e PLGF e esterológica da membrana corioalantóide a termo em éguas: influência sobre o peso e altura de potros ao nascimento", protocolado sob o nº 2466/2011, utilizando 50 (cinquenta) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research "Immunohistochemical evaluation on VEGF and PLGF expression and chorioallantoic membrane stereological in mares: weight and height influence in colts at birth", protocol number 2466/2011, utilizing 50 (fifty) horses, under the responsibility Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GUIMARÃES, Carina. Fátima.

Título: **Expressão de VEGF (VEGFR1/VEGFR2) e avaliação estereológica da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês: influência da pluriparidade sobre o peso dos potros ao nascimento**

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

Data ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Este trabalho é dedicado a ela e a ele,
minha mãe e meu pai como tudo o que faço em
minha vida. À dona Carolina e ao seu João.

Agradecimentos

À Deus por mais uma conquista em minha vida.

À minha Mãe, Carolina a melhor mulher que já conheci, pelo apoio incondicional, pelas lágrimas e sorrisos a cada conquista. Sem ela nada disso seria possível.

Ao meu Pai, Seu João, por tudo que me ensinou, pela força e luta do último ano, um ano difícil em nossas vidas, mas que superou tudo com muita fé.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, que me proporcionou estes anos de ensino e pesquisa.

À professora Doutora Claudia Barbosa Fernandes, pela orientação, carinho e amizade, por aceitar uma orientada e um grande desafio de braços abertos. Obrigada por todas as oportunidades. Você tem meu respeito, admiração e carinho para sempre. Eternamente prof.

À Pesquisadora Mariana Matera Veras, pela imensa ajuda na produção dessa dissertação, pela luz no mundo da placentologia, histologia, estereologia e imunohistoquímica, nada disso teria se concretizado sem sua ajuda, paciência e amizade. Muito obrigada por me acolher em seu laboratório.

Aos Professores Doutores Bruna Rosa Curcio e Carlos Eduardo Wayne Nogueira da Universidade Federal de Pelotas e as médicas veterinárias Lorena Soares Feijó, Claudia Haetinger que colaboraram de forma direta para a realização deste trabalho.

À professora Doutora Paula de Carvalho Papa e seu laboratório (LEME) por abrir as portas para que eu pudesse conhecer as técnicas laboratoriais.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal, verdadeiros educadores, muito obrigada pelos ensinamentos. Em especial aos professores Eneiva Carla Carvalho Celeghine, Clair Motos de Oliveira, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, Ricardo José Garcia Pereira e Anneliese de Souza Traldi (Kiky).

À Professora Carlinha, um agradecimento especial, pela orientação no Treinamento Técnico, pela grande amizade e apoio, exemplo de ser humano e de profissional. Muito obrigada.

Ao amor, sem ele eu nada seria. Ao meu amor, Edi por acreditar em mim. E entender minha faltas nesses últimos anos, muito obrigada pelo apoio, compreensão, carinho e amor, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus queridos segundos pais Márcia e Edinho e meu cunhado Victor, um agradecimento muito especial, talvez o mais importante para esta conquista, sem o apoio incondicional de vocês, eu nunca teria conseguido realizar este sonho. O meu muito obrigado seria muito

pouco para expressar o que vocês significam para mim.

A minha querida sogra Neire muito obrigada pela amizade e por todo o apoio, você faz parte dessa conquista.

Ao Carlos Eduardo Coradassi, o pai, o amigo, o professor, o terapeuta. Você foi o modelo que eu sempre quis seguir, um dos maiores incentivadores dessa conquista. A família Coradassi obrigada pelo carinho e apoio.

Natália, Gabriel, Carla, Adair, obrigada pela ajuda e amizade, sem vocês nunca teria superados os milhares de blocos e lâminas. Agradecimento ao LIM05 do Departamento de Fisiopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em especial as técnicas de laboratório Ana e Esmeralda, pela ajuda.

À minha colega de mestrado Marcela Meirelles, obrigada pelo apoio na condução desse trabalho.

Aos meus amigos da Pós-graduação, que foram tão importantes nesses anos de convívio. Guta Alonso, Andressa Dalmazzo, Bruna Oliveira, Shirley Flores, Roberta Harue, Lais Vieira, Júlia Soares, Bruno Monteiro, Márcio Mendanha, Fernanda Ragazzi e Gisele Veiga Vocês são muito mais que amigos da pós-graduação, serão para sempre meus amigos do coração. Obrigado pela amizade, apoio e carinho sempre.

Aos meus mais novos amigos, equipe do LIM 16, Maria Angélica, Carolina Romão, Sônia Soto, Priscila Seravalli, Karen Jang, Ivone de Oliveira e Luzia Furukawa. Ao professor doutor Joel Heimann pelos pela orientação no Treinamento Técnico.

As secretárias do Departamento Roberta Viana, Thais Soto e Harumi Doi Shiraishi, minhas queridas amigas, obrigada pela força, energia e amizade sempre.

À minha irmãzinha do coração, mineirinha, Jacqueline Ribeiro de Castro, minha amiga, orientadora e veterinária de plantão, obrigada pela amizade e força durante estes anos, você é umas das melhores coisas de morar em São Paulo.

Agradecimento especial a todos que colaboraram comprando trufas e panetones, vocês também contribuíram para esta realização.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

A todos que de alguma forma fazem parte dessa história!

“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos”.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

GUIMARÃES, C. F. **Expressão de VEGF (VEGFR1/VEGFR2) e avaliação estereológica da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês: influência da pluriparidade sobre o peso dos potros ao nascimento.** [Expression of VEGF (VEGFR1/VEGFR2) and stereology evaluation of the chorioallantoic membrane at term in Thoroughbred mares: influence of parity in foal birth weight]. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A interação materno fetal na espécie equina depende exclusivamente da complexidade anatômica e fisiológica da placenta e este órgão endócrino provisório é a peça chave do presente estudo, onde objetivou-se avaliar a influência do número de partos sob a eficiência placentária. Buscando, por meio da morfometria das macro e microrregiões, além da expressão do VEGF, VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/FLK-1 na membrana corioalantóide a termo, dados referentes à inter-relação da pluriparidade, contato materno fetal e peso dos neonatos da raça Puro Sangue Inglês. O delineamento experimental consistiu em um estudo analítico, observacional, transversal, prospectivo. Foram acompanhados cinquenta partos de éguas divididas em três grupos de acordo com a pluriparidade: primíparas (n=18), 2 a 5 partos (n=14) e 6 a 10 partos (n=18). Foram coletados e fixados em formol fragmentos de 3 cm² das regiões do corpo do útero (Cut), corno uterino gestante (CG) e corno uterino contralateral (CnG) da membrana corioalantóide a termo pós delivramento. Após processamento foram corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina e Picro-Sirus-Red. Os estudos imunohistoquímico (método avidina-biotina) e estereológico foram realizados ao microscópio óptico. Foram correlacionados número de partos, altura e perímetro torácico (PT) maternos; idade, altura e PT paternos; composição volumétrica dos compartimentos placentários juntamente com as áreas de superfície de contato materno-fetal e peso, altura e escore de vitalidade neonatal. A paridade, além de diretamente relacionada ao peso do neonato, demonstrou na avaliação morfofuncional ser determinante ao ganho de eficiência placentária. As membranas corioalantóides das éguas pluríparas tenderam a apresentar maior volume total no CG, aumento na porcentagem e volume total de vilos, além de maior densidade microcotiledonária e expressão do VEGF na região do CG. Entre as muitas correlações determinadas no grupo primíparas as mais relevantes foram peso da membrana com variáveis neonatais como peso (r=0,598), PT (r=0,775), tempo para mamar (r=0,553) e tempo de

gestação ($r=-0,527$), além do PT da mãe com o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=0,564$), reflexo de sucção ($r=0,625$), para levantar ($r=0,756$) e decúbito esternal ($r=-0,590$). Da mesma forma no grupo 2 a 5 partos, neonatos que nasceram com maior peso, altura, e PT apresentaram menor tempo para levantar ($r=-0,546$; $r=-0,869$, $r=-0,892$), eliminação do mecônio ($r=-0,535$) e ruptura do cordão umbilical ($r=-0,528$; $r=-0,881$). Assim como no grupo 6 a 10 partos, o peso do potro apresentou correlação com o peso ($r=0,793$), PT ($r=0,716$) e altura ($r=0,667$) materna. O volume total do CG correlacionou com volume total do parênquima ($r=-0,816$) e epitélio nos vilos placentários do CG ($r=-0,915$), tempo de gestação ($r=-0,483$), tempo para reflexo de sucção ($r=-0,672$), para mamar ($r=-0,525$), e para eliminação do mecônio ($r=-0,525$). No que diz respeito às variáveis paternas, o peso paterno correlacionou com o volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG ($r=0,393$), além do PT do garanhão com o peso ($r=0,316$) e PT ($r=0,425$) do potro e volume total do CG ($r=0,319$). Desta forma, acredita-se que estes resultados possam fornecer ferramentas práticas para auxiliar na escolha das fêmeas e machos mais indicados para geração de potros neonatos com desenvolvimento adequado.

Palavras-chave: Equinos. Interação materno-fetal. Placenta. Angiogênese. Neonato.

ABSTRACT

GUIMARÃES, C. F. **Expression of VEGF (VEGFR1/VEGFR2) and stereology evaluation of the chorioallantoic membrane at term in Thoroughbred mares:** influence of parity in foal birth weight. [Expressão de VEGF (VEGFR1/VEGFR2) e avaliação estereológica da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês: influência da pluriparidade sobre o peso dos potros ao nascimento]. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Fetomaternal interaction in equine species depends exclusively on the complexity of placental anatomy and physiology. This transient endocrine organ is the key of the present study, which aimed to evaluate the influence of parity on placental efficiency. Morphometric of macro and micro regions, expression of VEGF, VEGFR-1/Flt-1 and VEGFR-2/FLK-1 in term chorioallantois were performed and data regarding parity, fetomaternal contact and neonatal weight were evaluated in Thoroughbred. The experimental study consisted of an analytical, observational, cross-sectional, prospective study. Fifty deliveries were monitored in mares divided into three groups according to parity: nulliparous (n=18), 2 to 5 deliveries (n=14) and 6 to 10 deliveries (n=18). Tissue sections measuring 3 cm² were collected and fixed in formol saline from term chorioallantois regions: uterine body (UtB), pregnant uterine horn (PH) and contralateral uterine horn (CtH). After processing, samples were stained using Hematoxylin-eosin and Picro-Sirus-Red. Immunohistochemistry (avidin-biotin method) and stereology were performed using an optic microscope. Correlations between parity, maternal height and thoracic perimeter; paternal age, height and thoracic perimeter; volume composition of placental compartments, surface area of fetomaternal contact and weight, height and neonatal vitality score were performed. Parity was directly related to weight of the neonate and demonstrated in morphofunctional evaluation to be determinant for placental efficiency. Chorioallantoic membranes from pluriparous mares tended to have greater total PH volume, higher percentage and total villi volume, and greater microcotyledonary density and VEGF expression in PH region. There were several correlations found in nulliparous group, the most relevant were membrane weight and neonatal parameters such as weight (r=0,598), thoracic perimeter (r=0,775), time to nurse (r=0,553) and gestational length (r=-0,527) and also mare's thoracic perimeter with time to rupture the umbilical cord (r=0,564), suckle reflex (r=0,625), time to stand (r=0,756) and to achieve sternal recumbency (r=-0,590). Likewise, for the 2 to 5 deliveries group, neonates that were born heavier, taller and with greater thoracic perimeter took less time to stand (r=-0,546; r=-0,869, r=-0,892), pass meconium (r=-0,535) and rupture

the umbilical cord ($r=-0,528$; $r=-0,881$). In the group of mares between 6 and 10 deliveries, foal's weight was correlated to maternal weight ($r=0,793$), thoracic perimeter ($r=0,716$) and height ($r=0,667$). Total PH volume correlated to total parenchyma ($r=-0,816$) and epithelium in placental villi in PH ($r=-0,915$), gestational length ($r=-0,483$), time to suckle reflex ($r=-0,672$), to nurse ($r=-0,525$), and pass meconium ($r=-0,525$). Regarding Paternal variables, paternal weight correlated to total parenchyma volume in placental villi of the CtH ($r=0,393$). Also thoracic perimeter of the stallion correlated to neonatal weight ($r=0,316$) thoracic perimeter ($r=0,425$) and total volume of the PH ($r=0,319$). Therefore, these data provides rationale for an adequate choice of mares and stallions to generate well-developed neonates.

Palavras-chave: Equine. Placenta. Neonate. Fetomaternal interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Identificação das zonas da membrana corioalantóide a termo de éguas após o delivramento. Fotografia em formato “F” segundo Allen e colaboradores (2002). A: estrela cervical, B: Corno Gestante (CG), C: Bifurcação dos cornos, G: Corpo do útero (Cut), D: Corno Não Gestante (CnG), E: Membrana amniótica. (B) Mensuração do volume das zonas placentárias com o auxílio do *software* Image J® 62
- Figura 2 - (A) Compartimentos da membrana corioalantóide a termo de éguas: microcotilédone (M), córion (C), Mesoderma alantóide (Ma) e vasos do alantóide (V). Imagem histológica do CnG. Coloração HE. Aumento de 2x. (B) Estimativa do córion (C), microcotilédone (M), Mesoderma alantóide (Ma) e vasos do alantóide (V) da região do CG. Geração de sistemas teste com o auxílio do *software* Image J®. Coloração HE. Aumento 2x 64
- Figura 3 - Mensuração do número, altura (a) e comprimento da base (b) dos microcotilédones, com auxílio do *software* J® em fotomicrografia escaneada pelo equipamento Panoramic SCAN®, com o auxílio do *software* Panoramic Veiwier®. Número de vilos (1, 2) por unidade de comprimento (linha preta). Coloração HE. Aumento de 2x 65
- Figura 4 - (A) Fotomicrografia obtida com auxílio do *software* Image J®, para estimativa da composição tecidual dos microvilos da membrana corioalantóide a termo na espécie equina. Capilares fetais (a), mesênquima (b) e epitélio coreal (c). Coloração Picro-Sírius-Red. Objetiva de 40x. (B) Contagem das intersecções entre os arcos ciclóides e os vilos, para estimativa da área de superfície dos vilos da membrana corioalantóide a termo na espécie equina. Geração de sistemas teste com o auxílio do *software* Image J®. Coloração HE. Aumento de 10x 66
- Figura 5 – Fração de volume das diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo (% de volume da membrana aminiótica, % de volume da estrela cervical, % de volume do Corno não Gestante (CnG), % de volume do Corpo do útero (Cut) e % de volume do Corno Gestante (CG) em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) 71
- Figura 6 - Volume Total (VT) (cm³) dos microcompartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) da membrana corioalantóide a termo no Corno Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Corno Gestante (CG), em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes indicam tendência a diferença estatística entre os grupos ($p < 0,06$) 71
- Figura 7 - (A) Representação das porcentagens médias dos microcompartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide)

relacionados ao Corno Gestante (CG), da membrana corioalantóide a termo. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). (B) Representação do volume total (cm^3) dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do CG da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam tendência a diferença estatística entre os grupos ($p < 0,06$) 72

Figura 8 - (A) Porcentagem média dos microcompartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do Corno não Gestante (CnG) da membrana corioalantóide a termo. (B) Representação do volume total (cm^3) dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do CnG da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) 73

Figura 9 - (A) Porcentagem de volume dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) relacionado ao Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo. (B) Representando do volume total (cm^3) dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do Cut da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) 74

Figura 10 - (A) Altura média dos microcotilédones nas diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo Corno não Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Corno Gestante (CG) em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). (B) Representação do comprimento médio dos microcotilédones nas diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo CnG, Cut e CG em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam tendência à diferença estatística entre os grupos ($p < 0,06$) 75

Figura 11 - (A) Volumes totais dos vilos nas diferentes zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), e Corpo do útero (Cut), da membrana corioalantóide a termo. (B) Representação dos volumes totais dos vasos nos vilos placentários CG, CnG e Cut da membrana corioalantóide a termo. (C) Representação dos volumes totais do mesênquima nos vilos placentários nas zonas placentárias CG, CnG e Cut, da membrana corioalantóide a termo. (D) Representação dos volume totais do trofoblasto nos vilos placentários nas zonas placentárias CG, CnG, Cut, da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) 76

- Figura 12 - Fração de área marcada para o imunomarcador VEGF convertida em volume absoluto para as diferentes zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), e Corpo do útero (Cut), da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês para os grupos primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) 82
- Figura 13 - Fotomicrografia da membrana corioalantóide a termo das éguas Puro Sangue Inglês, para a obtenção da área marcada para o imunomarcador VEGF. (A) Corno Gestante (CG) do grupo primíparas, (B) Corno não Gestante (CnG) do grupo primíparas, e (C) Corpo do útero (Cut) do grupo primíparas. (D) CG do grupo 2 a 5 partos, (E) CnG do grupo 2 a 5 partos, (F) Cut do grupo 2 a 5 partos. (G) CG do grupo 6 a 10 partos, (H) CnG do grupo 6 a 10 partos, (I) Cut do grupo 6 a 10 partos. (J) controle negativo da reação e (L) controle positivo (endométrio de égua em estro). Contra coloração HE. Aumento de 4x 83
- Figura 14 - Fração de área marcada para o imunomarcador Flt-1 (A) e representando a fração de área marcada para o imunomarcador Flk (B) convertidas em volume absoluto, para as diferentes zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), e Corpo do útero (Cut), da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês para os grupos primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise descritiva (Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão) das variáveis, peso do potro, peso da membrana corioalantóide e volume da membrana corioalantóide a termo, relacionada ao número de partos das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013	70
Tabela 2 - Análise descritiva (Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão) da densidade total de superfície dos vilos (um^{-1}) e a superfície total dos vilos (m^2) da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013	74
Tabela 3 - Análise descritiva (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) da densidade microcotiledonária total (número de cotilédones por unidade de comprimento) das zonas placentárias Corno não Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Corno Gestante (CG) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sague Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013	77
Tabela 4 - Análise descritiva da densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do Corno Gestante (CG) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013	77
Tabela 5 - Análise descritiva da densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do Corno não Gestante (CnG) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013.....	77
Tabela 6 - Análise descritiva da densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013	78
Tabela 7. - Análise descritiva da Eficiência Placentária, (razão peso do potro por área de placenta (Kg/m^2) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013	78
Tabela 8 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) do Grupo (Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corno Gestante (CG) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	79

Tabela 9 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) do Grupo (Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corno não Gestante (CnG) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês (PSI) - São Paulo – 2013	79
Tabela 10 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) do Grupo (Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	80
Tabela 11 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) das regiões (zonas) placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo Primíparas - São Paulo – 2013	80
Tabela 12 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) das regiões (zonas) placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo 2 a 5 partos - São Paulo – 2013	81
Tabela 13 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) das regiões (zonas) placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês, para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo 6 a 10 partos - São Paulo – 2013	81
Tabela 14 - Correlação entre variáveis placentárias (Peso e Volume total da membrana corioalantóide, Volume total do Corno Gestante (CG), Volume total dos vilos e Mesoderme alantóide no CG, Volume total do córion no Corno não Gestante (CnG), Volume total dos vasos no CnG, Volume total do parênquima dos vilos placentários, Volume total do epitélio dos vilos placentários, Volume total dos vilos placentários) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo primíparas das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013.....	104
Tabela 15 - Correlação entre variáveis neonatais e maternas (Peso do potro, Tempo de gestação e PT da mãe) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo primíparas das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	106
Tabela 16 - Correlação entre variáveis neonatais (Tempo para reflexo de sucção) e maternas (Peso do potro, Tempo de gestação, Peso e PT da mãe) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo 2 a 5 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013.....	106
Tabela 17 - Correlação entre variáveis placentárias (Peso, Volume total, Volume total dos vilos, Volume total da mesoderme alantóide, Volume total do	

parênquima nos vilos placentários do Corpo do útero (Cut), Volume total dos vasos nos vilos, volume total do epitélio dos vilos da placentários) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo 2 a 5 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	107
Tabela 18 - Correlação entre variáveis neonatais (Peso, Altura e Perímetro Torácico) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais do grupo 6 a 10 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013.....	108
Tabela 19 - Correlação entre variáveis placentárias (Peso e Volume total da membrana corioalantóide, Volume total do Corno Gestante (CG), Volume total do córion no CG, Volume total dos vasos no CG, Volume total e Volume total córion no Corpo do útero (Cut), Volume total da mesoderme e do alantóide no Cut, Volume total dos vasos do alantóide no Cut, Volume total dos vasos no Cut, Volume total dos vilos no Cut, Volume total dos vilos no Corno não Gestante (CnG), Volume total dos vasos no CnG, Volume total do córion, Volume total da mesoderme nos vilos placentários, Volume total dos vasos nos vilos placentários e Volume total da mesoderme alantóide, Volume total dos vasos nos vilos placentários, Volume total dos vilos) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais do grupo 6 a 10 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	110
Tabela 20 - Correlação entre variáveis maternas (Tempo de gestação, Altura e Perímetro Torácico das mães) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais do grupo 6 a 10 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	111
Tabela 21 - Correlação entre variáveis paternas (Idade, Peso e Perímetro Torácico dos garanhões) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais dos animais Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013	112

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 HISTÓRICO.....	22
2.2 DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO E INTERAÇÕES MATERNO FETAIS NA ESPÉCIE EQUINA	23
2.2.1 Terço Inicial.....	25
2.2.2 Terço Médio	26
2.2.3 Terço Final.....	28
2.3 O PAPEL DO VEGF NA ANGIOGÊNESE PLACENTÁRIA DA ESPÉCIE EQUINA	30
2.4 FATORES RELACIONADOS À EFICIÊNCIA PLACENTÁRIA NA ESPÉCIE EQUINA	35
3 HIPÓTESE	53
4.1 GERAIS	54
4.2 ESPECÍFICOS	54
EFICIENCIA PLACENTÁRIA NA ESPÉCIE EQUINA: INFLUÊNCIA DA PLURIPARIDADE SOBRE A MORFOMETRIA, ANGIOGÊNESE E PESO DOS POTROS AO NASCIMENTO	57
5 INTRODUÇÃO	57
6 MATERIAIS E MÉTODOS	59
6.1 POPULAÇÃO ANALISADA E AMOSTRAS	59
6.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS	59
6.3 AVALIAÇÃO ESTEROLÓGICA.....	60
6.3.1 Volume Total da Membrana corioalantóide	60
6.3.2 Volume das Zonas Placentárias	61
6.3.4 Densidade, altura e comprimento dos microcotilédones.....	63
6.3.5 Composição tecidual dos microvilos da membrana corioalantóide nas diferentes regiões placentárias ..	64
6.3.6 Área de superfície de contato materno fetal.....	65
6.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	66
6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
7 RESULTADOS	69
8 DISCUSSÃO.....	84

REFERÊNCIAS.....	90
QUAIS VARIÁVEIS MATERNAS, PLACENTÁRIAS E PATERNAS INFLUENCIAM NA BIOMETRIA E VITALIDADE DE NEONATOS EQUINOS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS?	97
9 INTRODUÇÃO.....	97
10 MATERIAIS E MÉTODOS	99
10.1 POPULAÇÃO ANALISADA	99
10.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS	99
10.3 AVALIAÇÃO ESTEROLÓGICA.....	100
10.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	101
11 RESULTADOS.....	102
11.1 GRUPO ÉGUAS PRIMÍPARAS	102
11.2 GRUPO ÉGUAS PLURÍPARAS 2 A 5 PARTOS	104
12 DISCUSSÃO	111
13 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
REFERÊNCIAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

O mercado equino busca cada vez mais animais com melhor desenvolvimento e desempenho atlético. Com base nessas necessidades, pesquisas científicas procuram relacionar variáveis que comprovem a influência de determinadas características no desenvolvimento futuro desses animais, de forma a projetar qual será o possível desempenho do neonato em sua vida adulta (RODRIGUES, 2006).

Allen et al. (2002a) e Veronesi et al. (2010) observaram uma correlação entre características placentárias e características dos potros ao nascimento. Yamamoto, Asai e kusunose (1993) demonstraram a existência de correlação entre as variáveis, peso e altura de potros ao nascer e altura na vida adulta. Assim fica evidente a importância de trabalhos que abordem o conjunto de variáveis maternas, paternas, placentárias e neonatais, podem contribuir muito na obtenção de correlações pertinentes a área.

Diante do exposto e visando alternativas para a manutenção de fêmeas mais velhas no plantel reprodutivo, acreditamos que uma análise morfológica completa, incluindo a determinação da área de contato materno fetal e eficiência placentária, além da expressão de fatores de crescimento possam acrescentar informações importantes, fornecendo subsídios para entendermos os mecanismos envolvidos na placentação de éguas com diferentes pluriparidades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A história entre humanos e cavalos vem sendo escrita há milhares de anos. O cavalo moderno, *Equus caballus*, pertence à família *Equidae*, ordem Perissodactyla, descendentes dos Condylarthra, um grupo primitivo de mamíferos há milhares de anos extintos, os quais foram os ancestrais de todos os mamíferos de cascos. Fósseis encontrados datam de 60 milhões de anos de evolução do cavalo moderno. Começando com o Eohippus, também conhecido como Cavalo Dawn, há 54 milhões de anos atrás, o qual teria vivido na América do Norte durante a época do Eoceno. Durante o processo de evolução, a mudança mais significativa ocorreu ao longo da época do Mioceno (25 a 7 milhões de anos) quando as florestas deram lugar a pastagens e os ancestrais dos cavalos tornaram-se moradores das planícies. Durante a Era do Gelo, migraram por pontes de terra para a Europa, Ásia e África. Entretanto, o desaparecimento dessas pontes (Estreito de Gibraltar e o Estreito de Bering) por volta de 10 mil anos, significou que animais poderiam ser extintos em um determinado continente, sem a possibilidade de repovoação pelo menos sem o ajuda do homem (CAVALO DE SALTO, [2013]).

Desde que o homem começou a montar cavalos, os cavaleiros disputam corridas, por prazer, glória ou para comprovar o valor de sua montaria. Mas somente no século XVII, na Inglaterra, que se estabeleceram corridas organizadas. As corridas permitiam selecionar os animais mais rápidos tanto para o serviço militar quanto para o civil. Assim, três garanhões orientais da raça Árabe foram importados para a Inglaterra: Darley Arabian, Byerley Turk e Godolphin Arabian, os quais em cruzamento com éguas britânicas deram origem a uma nova raça, o Puro Sangue Inglês (PSI). A raça é conhecida como “cavalo de corrida” devido à modalidade a qual se destina (EQUINOCULTURA, [2013]). Em 1791 foi instituído e publicado pela família Weatherby, o *studbook* da raça PSI (LAROUSSE, 2006).

A paixão pelos cavalos corredores foi tamanha, que os locais para a prática do esporte se multiplicaram pela Inglaterra, não apenas pelo prazer do público em ver o desempenho dos cavalos, mas também pelas possibilidades de ganhos financeiros. Assim as corridas hípcas passaram a ser organizadas em todo o mundo. Atualmente, o PSI é criado em todos os continentes, em países como Estados Unidos, Argentina, França, Rússia, Alemanha, Austrália,

Colômbia e Brasil, onde representam mais de 20 mil animais (LAROUSSE, 2006).

Assim, a busca de animais com melhor desenvolvimento e desempenho atlético fez parte da história da equideocultura no mundo e permanece como o foco de muitos criadores. Com base nessas necessidades, pesquisas científicas procuram relacionar a influência de determinadas variáveis no desenvolvimento futuro desses animais (RODRIGUES, 2006). Algumas destas variáveis compreendem o estudo da interação materno fetal que mediará o desenvolvimento fetal durante toda a gestação.

2.2 DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO E INTERAÇÕES MATERNO FETAIS NA ESPÉCIE EQUINA

Historicamente a placenta é um órgão que vem despertando a curiosidade científica há muitos anos, seja por sua formação ou função. O termo placenta a princípio originou-se do grego *deútera*. Chamada posteriormente de secundina, palavra de origem latina. Contudo os primeiros a chamarem de placenta propriamente foram os gregos, *plakoûta*, que significa bolo redondo. Essa denominação do órgão foi utilizada pela primeira vez em 1523 por Fallopius, e descrita na “*De Re Anatômica*” por Realdus Columbus (SKINNER, 1961) assim o termo passou a ser aceito por anatomistas e obstetras.

A placenta é um órgão completo e especializado, com componentes maternos e fetais, sintetiza secreta e absorve uma vasta gama de substâncias como hormônios, fatores de crescimento, enzimas, proteínas e carboidratos, todos indispensáveis para o desenvolvimento do feto. Na espécie equina há evidências de que o peso fetal é refletido pela área de contato do alantocórion com o endométrio, contudo a eficiência placentária também desempenha papel determinante no crescimento fetal (WILSHER; ALLEN, 2003).

Os equídeos apresentam uma placenta classificada como microcotiledonária epiteliocorial, devido ao contato entre as camadas de tecido conjuntivo e epitelial com os capilares fetais (AMORIM et al., 2010), caracterizada como difusa, por apresentar vilosidades do córion na extensão de todo o tecido materno (AMORIM et al., 2010). Essas vilosidades agrupadas são denominadas microcotilédones (ALLEN et al., 2002a). Além disso, a membrana corioalantóide é aderida a todo o endométrio uterino, com padrão circulatório contracorrente e grau de implantação adecídua. Os capilares fetais e maternos estão separados no sentido uterino-fetal pelo endotélio materno, epitélio uterino, epitélio coriônico e capilares

fetais (DON, 2007). Levando em consideração tais características, Allen et al. (2002a) afirmam que as condições uterinas adequadas atuam diretamente no processo de placentação, influenciando o crescimento fetal.

A placenta estabelece trocas de nutrientes entre mãe e feto por meio dos microcotilédones, dependente da vascularização estabelecida entre os tecidos. Essas trocas estão relacionadas principalmente ao tamanho e à capacidade de irrigação destes microcotilédones (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Qualquer alteração em componentes placentários ou na dinâmica de troca pode afetar o desenvolvimento fetal (FOWDEN et al., 2006; JONES; POWELL; JANSSON, 2007). No entanto, o feto não é apenas um receptor passivo de nutrientes da placenta (FOWDEN et al., 2009). O desenvolvimento da arquitetura vascular é progressivo durante os períodos da gestação, vai aumentando de acordo com o desenvolvimento do feto e a maior necessidade de trocas materno fetais. Essas trocas dependem principalmente da vascularização estabelecida e do tamanho dos microcotilédones, que passam de 0,66 mm no terço médio da gestação a 1-2 mm a termo (ABD-ELNAEIM et al., 2006).

Os microcotilédones são compostos por interdigitações das vilosidades do corioalantóide com o endométrio materno (STEVEN; SAMUEL, 1975). Cada estrutura microcotiledonária é irrigada por uma artéria materna e um vaso fetal (WILSHER; ALLEN, 2003), podendo variar em tamanho nas diferentes partes do útero (COTTRILL et al., 1991). Bracher, Mathias e Allen (1996) afirmam que a maior idade das fêmeas equinas gestantes interfere no desenvolvimento dos microcotilédones reduzindo-os, tanto no tamanho das macrovilosidades, como das microvilosidades. Corroborando com esta informação, Wilsher e Allen (2003) relacionaram a redução na área de superfície dos microcotilédones com a degeneração endometrial em fêmeas idosas.

A placenta é considerada um órgão endócrino, ativo e transitório, capaz de secretar hormônios importantes para o desenvolvimento fetal (TROEDSSON; SAGE, 2001). Tal conjunto de membranas fetais tem como principais funções a nutrição e a respiração (ABD-ELNAEIM et al., 2006; FOWDEN et al., 2006; CAIXETA et al., 2008), remoção dos resíduos e excretas (WESTER, 2009), proteção biológica e mecânica que o feto necessita na vida intrauterina (GINTHER, 1992).

Visto que as funções da placenta são vitais para o desenvolvimento fetal, uma placenta normal e funcional é pré-requisito indispensável para que a gestação seja conduzida com sucesso e resulte em um produto sadio com desenvolvimento adequado (GINTHER, 1992; ALLEN; STEWART, 2001; WILSHER; ALLEN, 2003). Assim, serão descritos os principais

aspectos morfofuncionais da placenta no terço inicial, médio e final da gestação na espécie equina.

2.2.1 Terço Inicial

O embrião equino chega ao útero 144 a 168 horas após a ovulação (BATTUT et al., 1997) e, diferentemente do que ocorre em outras espécies como os ruminantes, ele é envolvido por uma cápsula, que impede que ocorra o alongamento embrionário. O embrião esférico, pela presença da cápsula inicia uma intensa movimentação por toda a superfície do útero (GINTHER et al., 1985), é estimulada pela contração e relaxamento miométrial sustentada pela secreção de PGF2 α e PGE2 pelo próprio embrião (STOUT; ALLEN, 2002). Essa movimentação entre os dias sete e 17 após a ovulação é apontada como parte do processo de reconhecimento materno da gestação, pois experimentos que restringiram parte do endométrio, impedindo a movimentação do embrião, resultaram em luteólise (MCDOWELL et al., 1985).

Dezesseis a 17 dias após a ovulação ocorre um aumento da tonicidade do miométrio, resultando na fixação do embrião em um dos cornos uterinos (GINTHER et al., 1983). Próximo ao dia 21 pós-ovulação, a cápsula é digerida pela ação de enzimas proteolíticas liberando as células trofoblásticas.

O desenvolvimento inicial da placenta ocorre durante a expansão do trofoblasto, a partir das três camadas germinativas denominadas ectoderma, endoderma e mesoderma. O ectoderma inicia sua extensão e forma o saco vitelínico. Posteriormente, o mesmo forma o âmnion, que consiste em um epitélio de camada única e translúcida avascularizada. O mesoderma dará origem ao córion, estrutura que formará a interface de trocas entre mãe e feto. Os vasos sanguíneos serão originados também a partir do mesoderma e posteriormente do alantóide, reunindo-se para a formação do cordão umbilical (DON, 2007). Histologicamente, a fusão entre mesoderma alantoideano e mesoderma coriônico forma o alantocórion, com invasão vascular (BANKS, 1992).

Hormônios, fatores de crescimento locais são a natureza dos estímulos que iniciam a intergitação placentária, que aumentam o crescimento e modificações na arquitetura do endométrio e do alantocórion por toda a gestação (ALLEN; STEWART, 2001).

Vinte e cinco a 35 dias pós-ovulação inicia-se a formação da cinta coriônica na

superfície do córion. Entre os dias 36 a 38 ocorre à invasão destas células no endométrio materno, formando estruturas denominadas cálices endometriais. Essas estruturas alcançam seu máximo tamanho e produtividade aos 70 dias de gestação, quando começam a se degenerar, desaparecendo da superfície do endométrio ao redor dos 120 dias de gestação (ALLEN; STEWART, 2001). Os cálices endometriais secretam Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), molécula glicoproteica de alto peso molecular, que tem como finalidade atividade biológica tanto de hormônio folículo estimulante (FSH) como de Hormônio Luteinizante (LH). Também têm função de promover a formação de corpos lúteos secundários e acessórios, aumentando consequentemente as concentrações séricas de progesterona materna (STEWART; ALLEN; MOOR, 1976).

Próximo aos 40 dias de gestação, alguns dias após a invasão do endométrio pelas células trofoblásticas, começam a aparecer ligações em forma de microvilos nas células do epitélio luminal, opostas ao endométrio (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1974), 20 dias após despontam vilosidades em formato digital da superfície do alantocóron com a superfície do endométrio.

Aos 60 dias de gestação os vilos alantocoriônicos ramificam-se extensivamente, tornam-se maiores e mais profundos (BRACHER; MATHIAS; ALLEN, 1996) coincidindo com a formação de criptas individuais aos 105 dias, dispostas em linhas irregulares, com uma densidade de aproximadamente 100/ mm². As entradas das criptas são irregulares com diâmetro de abertura de aproximadamente 0,05 a 0,15 mm² (MACDONALD; CHAVATTE; FOWDEN, 2000). Por volta dos 120 dias, as primeiras unidades de trocas hemotróficas, os microcotilédones, são formados (BRACHER; MATHIAS; ALLEN, 1996). A maximização da área microscópica de contato entre as camadas epiteliais maternas e fetais para as trocas de nutrientes é facilitada pela aproximação dos capilares sanguíneos em ambos os lados da interface (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1976).

Por volta dos 120 dias de gestação, ocorre uma notável mudança na densidade e comprimento dos vilos fetais, assim como na microvasculatura em éguas mais jovens. Os vilos fetais terminais tornam-se mais longos e ponteados e os capilares fetais tornam-se mais denso, formando uma rede (ABD-ELNAEIM et al., 2006).

2.2.2 Terço Médio

Morfologicamente aos 165 a 180 dias a placenta exhibe aglomerados de vilos, com taxa de crescimento de $<0,1\text{mm}$ para aproximadamente $0,35\text{ mm}$. As criptas endometriais nessa fase apresentam aberturas maiores em torno de $0,08$ a $0,25\text{ mm}$ de diâmetro, e apresentam-se em grande quantidade, (mais de 60 por mm^2). Os aglomerados de criptas aos 165 dias representam pequenas carúnculas, com densidade de 1 a 2 mm^2 . Entre cinco e 24 aberturas podem ser vistas na base de cada microcarúncula (MACDONALD; CHAVATTE; FOWDEN, 2000). As glândulas endometriais, localizadas entre os microcotilédones, continuam funcionais durante a gestação. Nos locais onde essas glândulas se encontram as células trofoblásticas tornam-se pseudoestratificadas, adaptadas para absorção exócrina, da nutrição histotrófica, estabelecendo assim uma segunda via de nutrição (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1977).

Uma placenta microcotiledonária saudável anexada em todo o endométrio e inteiramente funcional é pré-requisito para a continuidade da gestação. Quaisquer problemas no contato materno fetal durante a segunda metade da gestação resultam em abortamento ou complicações neonatais (BRACHER; MATHIAS; ALLEN, 1996).

Com o avanço da idade, a área de troca placentária pode ser reduzida, por degenerações ou disfunções das glândulas endometriais, degenerações ou oclusão de veias endometriais ou por fibrose generalizada do estroma, somada à atonia miometrial que pode causar estase linfática e desenvolvimento e distensão de lacunas linfáticas causando cistos endometriais repletos de linfa no lúmen uterino (LUDWING et al., 2001).

Em éguas mais velhas com endometrose aos 179 dias de gestação, os microplacentônios ainda estão globulares a ovais em sua conformação, mas seus ápices aumentam em relação ao terço inicial. Tornando-se maiores com largura média de $534 \pm 36,07\text{ }\mu\text{m}$ e altura $606 \pm 30,64\text{ }\mu\text{m}$. Nesta fase o microcotilédone está claramente separado em vilo primário, secundário e terminal, ancorado na cripta materna correspondente (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Muitos dos capilares fetais têm aparência oval-achatada em secção transversal e a média do diâmetro diminuiu para $8,8 \pm 0,28\text{ }\mu\text{m}$, resultando em distinta redução da distância hemodinâmica entre mãe e feto ($14,28 \pm 0,42\text{ }\mu\text{m}$) (ABD-ELNAEIM et al., 2006).

Aos 179 a 199 dias cada microcotilédone fetal consiste em um grande número de vilos coriônicos e zonas inter-microcotiledonárias. O lado materno em éguas pluríparas mostra uma porção intermediária e muitos vilos terminais, cada vilo é ramificado em 4 ou 5 vilos terminais, com aparência curta e grossa, com áreas dilatadas principalmente na parte final do vilo. A arquitetura vascular dos vilos fetais é formada por capilares de vários diâmetros, que juntos formam uma malha. As extremidades dos vilos com capilares de diâmetro

relativamente largo são chamadas de vilos terminais tipo 1. Enquanto a maior parte das extremidades terminais em forma de dedos são classificadas como vilos tipo 2. O vilos terminal tipo 2 aparece dominante em relação ao vilos terminal tipo 1. Os capilares fetais apresentam um grande aumento em densidade e exibem uma rede microvascular mais robusta. Aos 199 dias, em éguas primíparas, o padrão é similar às éguas com 179 dias de gestação, exceto pelos vilos fetais se apresentarem mais alongados (ABD-ELNAEIM et al., 2006).

Uma característica endócrina da gestação equina é altas concentrações de estrógenos séricos e na urina materna entre os dias 100 e 320 da gestação. Incluem tanto os estrogênios fenólicos comuns, estrona e estradiol-17beta, estrogênios insaturados equilenina, equilina, todos derivados da aromatização placentária de precursores do C-19, secretadas pelas gônadas fetais (PASHEN; ALLEN, 1979b; TAIT; SANTIKARN; ALLEN, 1983). Há um aumento acentuado da secreção de tais hormônios por volta do dia 80 da gestação, devido à hipertrofia e hiperplasia das células intersticiais. Porém, assim que as gônadas atingem o peso de 300-400 gramas por volta dos 200-230 dias (HAY; ALLEN, 1975), a secreção cai novamente de forma a se tornar constante até o termo (WALT et al., 1979).

As funções da grande quantidade de produção de estrogênios feto-placentários durante a segunda metade da gestação não são totalmente claras. Pashen e Allen (1979b) trabalharam com gonadectomia fetal e indicaram que, da mesma forma que ocorre em ovelhas, a produção de estrógeno durante a gestação equina pode ser importante para estimular o desenvolvimento de vasos sanguíneos tanto endometriais como placentário, para facilitar as trocas de nutrientes e resíduos entre a mãe e feto. Tais hormônios também podem desempenhar um papel essencial na estimulação da síntese e armazenamento de prostaglandina F2alfa nos tecidos uterinos (PASHEN et al., 1982).

2.2.3 Terço Final

Apesar de Samuel, Allen e Steven (1974) sugerirem que o desenvolvimento completo dos microcotilédones se dá aos 150 dias de gestação, mais recentemente Macdonald, Chavatte e Fowden (2000) observaram um contínuo desenvolvimento em comprimento e ramificação das vilosidades microcotiledonárias até o termo.

No último estágio de gestação em fêmeas primíparas, os microplacentônios medem 2 mm de diâmetro. Nesta fase há a possibilidade de separação das partes fetal e materna da

placenta, podendo ser vista a olho nú, distinguindo aglomerados de vilos na superfície do alantocórion. A média de altura do trofoblasto fetal e do epitélio uterino é de $9,94 \pm 0,50 \mu\text{m}$ e $5,93 \pm 0,50 \mu\text{m}$, não diferindo de amostras aos 199 dias de gestação. Os capilares fetais também não diferiram na forma, das amostras de 199 dias, mas a média de diâmetro foi reduzida para $6,88 \pm 0,24 \mu\text{m}$ (ABD-ELNAEIM et al., 2006).

A densidade dos capilares varia muito com o desenvolvimento gestacional, sendo na fase inicial maior em éguas primíparas, contudo mudanças observadas no diâmetro capilar não parecem estar ligadas à idade materna ou paridade e sim a idade gestacional, com um declínio no diâmetro com o passar dos terços gestacionais até o termo (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Capilares dilatados foram vistos desde os períodos iniciais da gestação, particularmente na parte superior das vilosidades terminais, e aumentaram em número com o avançar da idade gestacional. Vilosidades terminais do tipo 2 exibiram dilatações em seus capilares, indicando que houve crescimento completo, apresentando no terço final da gestação vilosidades maduras, ativas no transporte transplacentário. Essas características também foram observadas em mulheres (LEISER et al., 1997) e ruminantes (ABD-ELNAEIM et al., 2003). Dilatações dessa natureza dispõem uma superfície endotelial expandida para a absorção, contudo podem reduzir a velocidade do fluxo sanguíneo local (LEISER et al., 1997) sem influenciar o equilíbrio e trocas transplacentárias de O_2 e CO_2 , podendo ajudar com transporte de solutos (ALBERTS et al., 2003).

Aos 309 dias, em éguas primíparas, os microcotilédones fetais aumentaram em largura e os vilos fetais tornaram-se mais longos e espessos, progredindo em todas as direções. Os capilares, desde a base, vilos intermediários e terminais estão arranjados de maneira paralela, ao longo do curso, os vilos apresentam simples ramificações formando as vilosidades terminais. As trocas transplacentárias ocorrem por meio do leito capilar, uma fina parede de capilares das vilosidades terminais. As circunvoluções destas vilosidades terminais são relativamente simples no primeiro terço da gestação, tornam-se mais complexas com o avançar do tempo gestacional, aumentando a anastomose. A altura do trofoblasto e do epitélio endometrial, tanto em diâmetro dos capilares fetais e a distância intervacular entre os capilares maternos e fetais, diminuem com o avanço da gestação (ABD-ELNAEIM et al., 2006) chegando a medir $15 \mu\text{m}$ próximo ao termo (ABD-ELNAEIM et al., 2003). Tal diminuição é resultado da redução da altura de ambas as células do trofoblasto e do epitélio endometrial, e também foi observada em outros animais que possuem placentação epitéliocorial. Contudo as éguas parecem possuir a menor distância, caracterizando uma maior capacidade da placenta em termos de difundir substâncias (ABD-ELNAEIM et al., 2003).

Os progestágenos secretados na fase final de gestação são suficientes em quantidade e ação biológica para a manutenção da gestação sem contribuição hormonal dos ovários maternos (HOLTAN et al., 1991). As concentrações hormonais séricas permanecem baixas e constantes entre os dias 150 e 300 da gestação, contudo, a placenta supre as necessidades hormonais na interface materno fetal. Após 300 dias de gestação há um aumento acentuado nas concentrações séricas maternas de progestágenos e esses níveis permanecem altos até 12-24 horas antes do parto, seguindo de uma queda brusca (THORBURN, 1993).

Há um conceito de cooperação interdependente entre o feto, a placenta e o endométrio, para criar a unidade fetoplacentária eficiente, a fim de produzir todos os estímulos hormonais necessários para manter a gestação e promover o crescimento fetal (ALLEN et al., 2002a).

2.3 O PAPEL DO VEGF NA ANGIOGÊNESE PLACENTÁRIA DA ESPÉCIE EQUINA

A neovascularização placentária é um processo fisiológico caracterizado pelo aumento inicial da vasculatura pela angiogênese (desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos já pré-existent no lado materno) e a vasculogênese (formação do plexo vascular derivado das células mesenquimais do mesoderma) do lado fetal da placenta (WINTHER; DANTZER, 2001).

O desenvolvimento vascular e a remodelação tanto de compartimentos maternos como fetais são essenciais para o início e manutenção da gestação em mamíferos. O desenvolvimento da vascularização endometrial e a espessura do endométrio estão associados ao sucesso da implantação em mulheres (TORRY; HINRICHS; TORRY, 2007). A mudança da nutrição primária histotrófica para a nutrição hemotrófica é ainda de maior importância em animais de placentação epiteliocorial (AMOROSO, 1952).

Há muitos fatores de crescimento envolvidos na regulação fisiológica da formação e manutenção de novos vasos, sendo que a ação destes deve ser muito bem regulada em relação a tempo, concentração, espaço e funcionalidade da rede vascular (YANCOPOULOS et al., 2000).

Em animais de laboratório e vários outros mamíferos tem sido relatado que os fatores de crescimento secretados localmente pelo endométrio e placenta atuam sinergicamente e estimulam um alto grau de hiperplasia e remodelamento tecidual associado à placentação em éguas (ALLEN et al., 2002a). Muitas são as proteínas encontradas no processo de

placentação, entre elas as proteínas da família dos fatores de crescimento que têm fundamental importância, em especial o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus respectivos receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 (ALLEN et al., 2002a).

O VEGF é uma glicoproteína com atividades de proliferação celular, morfogênica e de quimiotaxia, sendo também um potente estimulador da vasculogênese induzida (ALLEN; WILSHER, 2007). Este fator ainda induz a permeabilidade vascular e apresenta-se aumentado em casos de hipóxia (LADOUX; FRELIN, 1993; SGAMBATI et al., 2004). Tanto o VEGF como seus receptores são cruciais não somente para a fisiologia da angiogênese em estágios iniciais da gestação como em adultos em estágios patológicos como no caso de neoplasias (SHIBUYA et al., 2012).

Em camundongos knockout para o VEGF, ocorrem problemas no desenvolvimento embrionário afetando a vasculogênese e hematopoese normal (FERRARA, 2004). Muitos estudos têm identificado o VEGF como fator chave em condições fisiológicas e patológicas (AHMED et al., 2000). O uso de inibidores de fatores de crescimento antes e após a implantação em ratos resultou em absorção dos embriões (KLAUBER et al., 1997), como também um aumento exagerado da expressão pode levar a morte fetal pelo aumento da vascularização e aumento de quantidade e volume celular (STOUFFER et al., 2001).

O VEGF pertence a uma família constituída de moléculas semelhantes, codificadas por um único gene, formadas por várias proteínas identificadas por uma letra (VEGF A-F) (FÁTIMA; PAPA, 2010). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica básica de 45 KD, ligante da heparina, codificada por um único gene ligado a angiogênese, com a habilidade de crescimento de células endoteliais derivadas de vasos e artérias já existentes (FERRARA, 2004). Segundo Fátima e Papa (2010) o VEGF-A possui várias isoformas. Codificadas a partir de quantidade de exons variadas, propriedades e padrões de expressão constante. Em humanos há oito isoformas descritas, o nome de cada isoformas é relativo ao número de aminoácidos presentes na molécula (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 e VEGF206). A quantidade de aminoácidos determina a características de cada um dos VEGFs, sua capacidade de ligação com a heparina e a solubilidade do mesmo (LANGE et al., 2003).

O VEGF-A possui dois receptores específicos de alta afinidade do tipo tirosina quinase VEGFR-1/Flt-1 (Fms – like tyrosine Kinase receptor 1) (DE VRIES et al., 1992) e VEGFR-2/KDR (KDR- Kinase insert Domain containing Receptor) (TERMAN et al., 1992). Esses receptores apresentam expressão quase restrita às células endoteliais (TERMAN et al., 1992; CHARNOCK-JONES; KAUFMANNB; MAYHEW, 2004).

Os receptores tirosina-quinase (RTKs) possuem sete domínios, de maneira semelhante a imunoglobulinas na porção extracelular, possuem uma região transmembrana única e uma sequência tirosina-quinase interrompida pelo domínio da inserção da quinase em sua porção intracelular (SHIBUYA et al., 1990).

Os dois receptores para o VEGF apresentam papéis diferentes no processo de angiogênese. O Flt-1 atua positivamente e negativamente regulando a formação de vasos sanguíneos e linfáticos (SHIBUYA et al., 2012). Fong et al. (1995) descreveram que ratos deficientes para Flt-1 desenvolvem células endoteliais, porém com grande distúrbio de formação do lúmen vascular. Em contrapartida ratos deficientes para o receptor Flk-1 não desenvolveram nenhuma célula endotelial (SHALABY, et al., 1995).

Lyall et al. (1997) compararam a expressão do VEGF em placentas humanas, advindas de gestações normais e gestações comprometidas, como restrição do crescimento intrauterino e condições de pré eclampsia. Os resultados demonstraram a diminuição da expressão do VEGF em condições patológicas, devido a um pobre desenvolvimento das vilosidades placentárias e aumento da pressão de O₂.

Além da hipóxia, o estradiol, LH, Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), FSH e o fator de crescimento semelhante a Insulina (IGF-1) são potentes estimuladores da secreção de VEGF em várias espécies (SCHAMS et al, 2001; KAZI; JONES; KOSS, 2005; PAPA et al., 2007).

O Fator de Crescimento Placentário (PLGF) é um membro da família dos fatores de crescimento, apresentando 53% de sua identidade derivada do fator de crescimento plaquetário (VOURELA et al., 1997). É uma proteína abundante na placenta humana, e tem sido relacionada à potencialização da atividade do VEGF (PARK et al., 1994).

O PLGF é produzido pelo trofoblasto, caracterizado pela ação secretora de proteínas e hormônios, desempenhando assim um papel de nutrição fetal. Utilizando a técnica de imunohistoquímica, Vourela et al. (1997) verificaram a expressão do PLGF no endotélio vascular de humanos, sugerindo uma ação parácrina. O PLGF é um estimulador menos eficiente de quimiotaxia e proliferação de células endoteliais quando comparado ao VEGF, que induz permeabilidade microvascular. O PLGF pode influenciar tanto em células endoteliais vasculares como trofoblásticas sugerindo que uma produção errônea desse fator pode comprometer a função celular durante a gestação e contribuir para afecções vasculares e placentárias observadas em muitas condições obstétricas complicadas em humanos (CLARK et al., 1996). O PLGF não tem efeito sozinho, age potencializando a ação de baixas doses de VEGF em células endoteliais (PARK et al., 1994), uma vez que PLGF liga-se ao receptor Flt-

1, mas não ao receptor Flk-1 (PARK et al., 1994). Assim, VEGF e o PLGF juntos formam um heterodímero com alto potencial mitogênico endotelial (DISALVO et al, 1995).

Charnock-Jones et al. (2001) indicam que VEGF atua de forma parácrina e estimulando o crescimento e atraindo capilares para a superfície epitelial. Essa atuação pode estimular o contínuo crescimento dos vasos sanguíneos ao longo da gestação, aumentando a área de superfície e consequentemente melhorando a capacidade de troca da placenta, por mecanismo de estimulação ou regulação da permeabilidade nas células endoteliais. Marcações imunohistoquímicas indicam que os locais de ligação para o VEGF são limitados às células endoteliais em placentas suínas.

Em humanos, o VEGF e seus receptores são expressos em diferentes períodos de gestação na placenta. A expressão de VEGF e Flk-1 é mais intensa durante o início da gestação, no estabelecimento das ramificações dos capilares e declinam após o primeiro trimestre (VUCKOVIC et al, 1996), enquanto o Flt-1 aumentam sua expressão com o avanço da gestação, do segundo ao último trimestre (CLARK et al., 1996). Em virtude de o PLGF atuar na regulação do crescimento, estabilidade e permeabilidade vascular da placenta, a expressão alterada desse fator gera insuficiência vascular na placenta e complicações obstétricas (TERRY; HINRICHS; TERRY, 2004). Contudo segundo Fátima e Papa (2010), a inativação dos genes relacionados ao PLGF em camundongos, não afetou o desenvolvimento pós-natal dos animais, porém em condições patológicas os autores demonstraram alterações angiogênicas e expressão aumentada de VEGF.

Desenvolvimento vascular da placenta é frequentemente alterado em complicações da gestação humana (MAYHEW; CHARNOCK JONES; KAUFMANN, 2004). Embora as alterações possam ser induzidas por vários fatores potenciais no ambiente intrauterino, mais atenção tem sido focada na disponibilidade de oxigênio, tanto na hipóxia como na hiperóxia placentária. Hipóxia, decorrente na maioria das vezes do comprometimento do suprimento arterial materno, resulta em exagerado desenvolvimento capilar das vilosidades e ramificações, estas mudanças são provavelmente o resultado de alterações sutis nas proporções de VEGF-A, PLGF entre outros fatores. O aumento das ramificações pode melhorar a eficiência placentária fornecendo mais circuitos artério-venosos que operam em paralelo, devolvendo o sangue fetal do cordão umbilical logo que tenha sido equilibrado com o oxigênio da mãe.

O VEGF e seus receptores Flk-1 e Flt-1 foram localizados no decorrer da gestação em equinos, principalmente em dois tipos celulares, o epitélio glandular e luminal do endométrio materno e no alantocórion do trofoblasto fetal. Allen e Wilsher (2007) determinaram que tais

fatores angiogênicos juntos podem facilitar o desenvolvimento da rede vascular materna e fetal para as trocas de produtos necessários durante o decorrer da gestação.

No terço inicial da gestação foi observada uma marcante expressão do receptor Flk-1 tanto no lado materno como no lado fetal associado à placentação, além da marcação de células do estroma materno (SILVA et al., 2011). A positiva expressão do receptor em ambas as células do endométrio e alantocóion durante este período inicial coincidem com o momento de rápida proliferação do crescimento placentário, sugerindo a probabilidade de que a presença do receptor se comporte como um fator angiogênico primário, corroborando com o que Charnock-Jones; Kaufmannb; Mayhew (2004) e Clark et al. (1996).

O Flk-1 pode ser responsivo às propriedades angiogênicas do VEGF para estimular o crescimento de múltiplos aglomerados de capilares em ambos os lados da placenta epiteliocorial. O trofoblasto equino mostra uma grande imunoreatividade ao receptor Flk-1 durante o período inicial, ao mesmo tempo em que a ligação do endométrio com o alantocóion se torna complexa (ALLEN; WILSHER, 2007).

Silva et al. (2011) encontraram padrão parecido entre a expressão de VEGF e do Flt-1 no endométrio de éguas nas fases folicular, luteal, gestante aos 14 dias e aos 21 dias. Intensa marcação para VEGF foi observada no epitélio luminal, em menor intensidade nas células epiteliais glandulares e células endoteliais. Células do estroma também foram marcadas embora dispersas e com menor intensidade. Os autores sustentam a hipótese que as mudanças na angiogênese e arquitetura endometrial são mediadas pela presença do conceito. Ainda que os eventos ocorridos no início da gestação como fase de mobilidade, fixação, orientação e a contato com o endométrio são comandados pelo remodelamento vascular uterino, que futuramente originará a placenta e nutrição hemotrófica.

Há similaridade da imunomarcação para VEGF em porcas e éguas. O desenvolvimento capilar materno e o aumento da ramificação do estroma, que forma o centro do microplacentônio equino, apresenta uma maior estimulação angiogênica do VEGF, secretado pelas glândulas endometriais e do epitélio luminal, enquanto o equivalente da formação capilar fetal recebe a estimulação vasculogênica do VEGF secretado pelas células trofoblásticas. Contudo a manutenção da forte marcação do epitélio glandular do endométrio pelo VEGF ao longo da gestação culmina com o aumento da densidade das glândulas endometriais estromais e aumento paralelo na intensidade da marcação do VEGF aos 309 dias de gestação. Estes achados sugerem que a fonte de VEGF glandular pode assumir dominância em ambos, capilares fetais e maternos no estágio final da gestação, uma vez que ocorre uma redução do desenvolvimento capilar fetal e materno em éguas mais velhas, que apresentam

comprometimento degenerativo do endométrio. Nessas éguas podem ocorrer um desenvolvimento não funcional dos aglomerados glandulares, reduzindo efetivamente a quantidade de nutrição histotrófica para o feto, somada a uma redução da expressão do VEGF (BRACHER; MATHIAS; ALLEN, 1996; WILSHER; ALLEN, 2003).

O aumento da intensificação da expressão do VEGF no terço final da gestação pode refletir condições de hipóxia em ambos os tecidos maternos e fetais, devido ao aumento da demanda de oxigênio pelo rápido crescimento do feto enquanto o crescimento utero placentário é desacelerado (REYNOLDS et al., 2006). Pashen e Allen (1979) sugerem que as altas concentrações de estrógenos secretadas pelo trofoblasto no final da gestação podem também atuar como regulador positivo para o VEGF.

2.4 FATORES RELACIONADOS À EFICIÊNCIA PLACENTÁRIA NA ESPÉCIE EQUINA

Em mamíferos, o maior determinante do crescimento intrauterino é o suprimento de nutrientes placentários para o feto. A capacidade de transferência de nutrientes depende do tamanho, morfologia, fluxo sanguíneo e a eficiência de transporte (FOWDEN et al., 2006). A placenta sintetiza e metaboliza nutrientes chaves que, somados às influências hormonais atuam na taxa de crescimento do feto (FOWDEN; FORHAED, 2004). Problemas em quaisquer desses fatores podem ocasionar mudanças no padrão de crescimento fetal (FOWDEN et al., 2006; JONES; POWELL; JANSSON, 2007).

Funcionalmente a eficiência placentária pode ser alterada por mudanças na capacidade da placenta de suprir os nutrientes ou hormônios para mãe e/ou para o feto. A placenta transporta nutrientes por difusão passiva ou ativa. Estes processos dependem da extensão e das características morfológicas da placenta, como área de superfície, espessura da barreira, densidade capilar e suprimento sanguíneo materno. Os processos de passagem mediados por transportadores específicos são influenciados pela atividade e localização destes nas membranas placentárias (SIBLEY et al., 2005). A difusão simples ou facilitada através da placenta é afetada pelo gradiente de concentração das membranas (HAY, 1994).

Eficiência placentária é comumente definida como gramas de feto produzidas por gramas de placenta (WILSON; FORD, 2001), podendo variar muito entre as espécies. Em humanos a taxa é de cerca de cinco grama/grama e em equinos 20 grama/grama (LEISER;

KAUFMANN, 1994). Elliott; Morton; Chopin, (2009) estabeleceram uma correlação positiva entre peso da placenta e peso do potro, sendo que para cada Quilograma de aumento no peso da placenta, há um aumento de 4,5 Quilogramas no peso do potro, e entre número de partos e o peso do potro ao nascer na magnitude de 0,5 quilograma a cada gestação.

Placentas epiteliocoriais podem ser tão eficientes quanto à hemocoriais, o que enfatiza a complexidade do transporte de nutrientes através da placenta (WOODING; BURTON, 2008). Uma explicação para as diferenças de eficiência placentária entre as espécies é a arquitetura vascular. Espécies com fluxo contracorrente, como os equinos e os murinos, têm maior eficiência placentária que espécies com fluxo multiviloso como ruminantes e humanos ou fluxo corrente cruzada como nos carnívoros (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Em qualquer idade gestacional, as medições da eficiência placentária, fornecem indicações das condições *in utero* e das adaptações no desenvolvimento feto-placentário ocorridas para satisfazer as exigências do crescimento fetal. As variações naturais da eficiência placentária podem ser explicadas por manipulações do fluxo sanguíneo, disponibilidade de oxigênio e composição da dieta materna. Em termos gerais a diminuição de oxigênio por anemia materna, redução do fluxo uterino ou hipoxemia direta reduz a eficiência placentária, enquanto a restrição de substrato para oxidação e crescimento, dieta de baixa caloria ou privação de proteína tende a aumentar a eficiência placentária, sugerindo que a eficiência placentária é responsiva às condições uterinas além da genética (FOWDEN et al., 2009).

Em geral, placentas mais eficientes transferem maior aporte de substratos em determinado peso, embora, placentas menores e menos eficientes possam também fornecer suporte adequado para o crescimento fetal (FOWDEN et al., 2008). Em ovelhas, uma placenta pequena resultante de carunclectomia leva à restrição de crescimento fetal, mas em contrapartida suporta 10 a 15 % mais fetos e transfere 40 a 50% mais de um análogo de glicose não metabolizada por grama que a placenta normal (OWENS; FALCONER; ROBINSON, 1989).

Placentas mais leves em geral são mais eficientes que as mais pesadas, o que sugere o papel do feto em direcionar a aquisição dos nutrientes. Em neonatos humanos, placentas que pesam menos que 300 gramas suportam em média 20 % mais massa fetal por grama de que aquelas que pesaram mais que 500 gramas, embora os bebês advindos de placentas menores pesem menos ao nascer quando comparados à média (SALAFIA et al., 2007).

A placenta pequena naturalmente ou de tamanho reduzido experimentalmente, adapta-se para manter o crescimento fetal por meio do aumento da sua eficácia, e pode

eventualmente, limitar o crescimento intrauterino e diminuir a eficiência pouco antes do nascimento, por aumento na demanda de nutrientes para o feto. Estas adaptações podem ser de origem morfológica ou funcional (FOWDEN et al., 2009).

A eficiência placentária pode ser modificada, alterando a área da superfície de troca, a espessura da barreira entre as circulações materna e fetal e/ou da densidade e arranjos arquitetônicos da vasculatura fetal e materna (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Em suínos e ovinos, as diferenças das raças na eficiência placentária estão associadas às mudanças na densidade capilar (WILSON; FORD, 2001; REYNOLDS et al., 2006). Do mesmo modo, em ninhadas de suínos, placentas menores são mais eficientes e apresentam uma maior vascularização imprimindo um aumento da expressão de VEGF (VONNAHME; WILSON; FROD, 2001). Para Vallet e Freking (2007) a espessura do contato materno fetal e a complexidade das camadas por unidade de área aumentou em placentas mais eficientes de ninhadas de suínos com 45 a 105 dias de gestação.

O aumento da densidade e volume capilar fetal também é visto nas áreas labirínticas responsáveis pela transferência de nutrientes nas placentas pequenas de cobaias expostas a hipóxia (BACON et al., 1984). Enquanto em ratos e camundongos a desnutrição materna acarreta um aumento da eficiência placentária no início da fase de crescimento (d 15-16), e posterior diminuição com o passar do tempo, quando a disponibilidade de nutrientes não cumpre as exigências do crescimento fetal, culminando na instalação da síndrome do crescimento intrauterino restrito (VAUGHAN, FOWDEN; COAN, 2008).

A espessura da barreira circulatória entre a mãe e o feto é aumentada em placentas menos eficientes em cobaias subnutridas (ROBERTS et al., 2001). Contudo em ninhadas de ratos não foram encontradas diferenças na espessura da barreira mesmo em animais com diferentes eficiências placentárias. Em placentas de ratos com menor eficiência aos 16 dias de gestação, a zona labirintica é caracterizada por uma grande proporção do volume total, havendo 35% mais superfície por grama de área de placenta comparada com placentas grandes da mesma ninhada. (COAN et al, 2008).

A densidade microcotiledonária refere-se ao número de microcotilédones por unidade de comprimento da superfície do alantocórion (ALLEN et al., 2002a). Histológica e estereologicamente a placenta equina apresenta variações no tamanho e na densidade das estruturas microcotiledonárias. Cottrill et al. (1991) relataram microcotilédones maiores e mais densos nas membranas alantocoriônicas referentes a região do corno não gestante e no topo do corno gestante, menores e mais espaçados na base do corno gestante e na região do corpo do útero. Os mesmos autores justificam tal distribuição como um padrão resultante do

grande estiramento do corpo uterino e corno gestante pelo desenvolvimento fetal, além do efeito gravitacional do peso sobre a superfície de contato do endométrio com o alantocóron.

Essas diferenças, tanto no tamanho das estruturas, quanto na densidade, podem ser descritas como estruturas maiores e mais densas em fêmeas pluríparas quando comparadas a primíparas, sugerindo que a maior densidade microcotiledonária está correlacionada diretamente com o maior peso do potro ao nascimento. Por outro lado, a variável idade das éguas apresenta uma correlação negativa com a densidade microcotiledonária (WILSHER; ALLEN, 2003).

A idade da fêmea gestante aparentemente pode afetar a formação de macro e microvilos placentários, tornando-os menores e com trocas mais diretas em éguas mais velhas quando comparadas às éguas mais jovens no mesmo período gestacional (BRACHER; MATHIAS; ALLEN, 1996).

Wilsher e Allen (2003) descreveram uma redução na superfície da área microcotiledonária tanto em éguas mais velhas, que apresentavam comprometimento degenerativo do endométrio, como em éguas primíparas. Corroborando com achados de Bracher, Mathias e Allen (1996), que afirmam ocorrer, em animais mais velhos, um subdesenvolvimento na porção do alantocóron, devido a regiões fibrosas do endométrio, tornando a absorção histotrófica reduzida, pela presença de glândulas degeneradas entre os microcotilédones. O resultado dessa menor interação materno fetal pode culminar na produção de potros mais leves (WILSHER; ALLEN, 2003).

Wilsher e Allen (2000) dividiram éguas PSI em quatro grupos de acordo com paridade e idade. Primíparas de quatro a sete anos, éguas pluríparas entre cinco e nove anos, entre 10 e 15 anos e acima de 16 anos. A avaliação das variáveis placentárias e o peso ao nascer dos potros foram menores nos grupos das primíparas quando comparadas aos demais grupos, principalmente no que diz respeito à densidade microcotiledonária de éguas pluríparas de cinco a nove anos. A densidade microcotiledonária também foi menor em éguas com mais de 16 anos quando comparadas aos outros dois grupos de éguas pluríparas, provavelmente resultante dos efeitos da degeneração endometrial senil. Contudo essa deficiência foi compensada pelo maior volume de área da placenta, o que justifica a média maior de peso dos potros ao nascimento, quando comparados aos potros nascidos de éguas primíparas.

Paridade parece ser mais importante para determinar o peso ao nascer do produto do que a idade materna, isso devido à redução da densidade microcotiledonária juntamente com a redução do volume do córion, diminuindo assim a área válida para trocas hemotróficas de nutrientes e gases (WILSHER; ALLEN, 2000). Rice (1998) considera o envolvimento de

várias vias no desenvolvimento da gestação. Sugere que a remodelação do útero para acomodar o crescimento fetal e placentário associados, tecidos e fluidos podem representar um mecanismo estimulatório que contribui para o concomitante crescimento uterino, dessa forma o feto pode ser primariamente responsável por este crescimento, ressaltando mais uma vez que o genótipo do feto é um significativo fator para determinar a área do alantocóion. A informação sugere a necessidade do útero de passar por um processo inicial de estimulação gerado pela primeira gestação, e assim desenvolver todo o potencial para o posterior melhor crescimento fetal.

Assim, para ovinos (DWYER et al., 2005) equinos (WILSHER; ALLEN, 2003) e camelídeos (BRAVO; GARNICA; PUMA, 2009), a eficiência placentária aumenta com a paridade durante a vida reprodutiva das fêmeas, mas declina com sucessivas gestações e com o avanço da idade materna.

Diferenças entre densidades microcotiledonárias podem explicar diferenças genótípicas entre raças. Segundo Allen et al. (2002a) há diferença na morfologia microcotiledonária entre diferentes raças de equinos. Os mesmos autores demonstram que a Transferência de Embriões (TE) entre raças de diferentes portes (PSI para Pônei e Pônei para PSI) pode restringir o potencial genético para o crescimento do embrião transferido, alterando assim o desenvolvimento da placenta. Avaliando morfometricamente pelo método da estereologia placentária, Allen et al. (2002a) encontraram correlação positiva entre peso materno, a área, o peso e o volume do alantocóion.

A menor densidade microcotiledonária da membrana corioalantóide das éguas Pônei em relação às éguas Puro Sangue, e uma maior área do alantocóion de neonatos Puro Sangue nascidos de éguas Pônei (ALLEN et al., 2002a) pode ser resultado de um provável aumento do comprimento dos vilos fetais e não um aumento das ramificações dos vilos, esse aumento do comprimento já é conhecido por ocorrer normalmente em gestações de Pôneis (MACDONALD; CHAVATTE; FOWDEN, 2000). Segundo, Veronesi et al. (2010) existe uma forte influência do genótipo do feto sobre a ramificação microcotiledonária.

Rossdale et al. (1984) demonstraram que embriões de raças de maior porte quando transferidos para raças de menor porte necessitaram de maiores cuidados neonatais nas primeiras 24 horas de vida. Em contraste os animais que contaram com um ambiente uterino maior apresentaram-se maiores e fisicamente maduros. Meirelles et al. (2011) realizaram TE entre raças de diferentes portes (embrião de Ponêi transferido para receptora Mangalarga e embrião de Mangalarga transferido para receptora Pônei) observaram que o potro nascido de placenta mais pesada tiveram maior altura, peso e perímetro torácico quando comparado ao

potro que nasceu de placentas mais leves. A restrição de crescimento gerada na TE de embriões de animais da raça PSI para a raça Pônei resultou em produtos com a metade do peso de um potro PSI ao termo, essa restrição atuou na redução da massa muscular e deposição de gordura. O aumento da demanda nutricional e estresse imposto pela restrição de espaço aumentaram a produção de pregnenolona pelas glândulas adrenais do feto, iniciando a cascata hormonal de indução ao parto, resultando em parto em média seis dias antes da data prevista (ALLEN et al., 2002a).

Cottrill et al. (1991), avaliaram variáveis como peso e área de superfície, avaliação macroscópica e histológica das membranas normais e comprometidas pós-parto, verificaram que a aparência histológica das placentas comprometidas foram relacionadas a potros natimortos ou com anormalidades neonatais.

A literatura considera estreita a relação entre falhas placentárias e viabilidade do neonato equino. Para neonatos humanos o escore Apgar é aplicado usualmente para avaliar os graus de asfixia neonatal e a necessidade de ressuscitação, durante o teste são avaliados alguns parâmetros como batimentos cardíacos, esforço respiratório, tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração das mucosas (CASEY; MCINTIRE; LEVENO, 2001). No entanto, apesar do escore APGAR ter sido modificado para a espécie equina, atualmente existe no Brasil uma preferência por avaliações como tempo de ruptura do cordão umbilical, tempo para decúbito esternal, tempo para reflexo de sucção, tempo para levantar, tempo para mamar, tempo para eliminação de mecônio, avaliação da mucosa oral (escore 1 a 4), avaliação da conjuntiva (escore 1 a 4), avaliação da esclera (escore 1 a 2), avaliação dos vasos episclerais (1 a 2), Avaliação do Tempo de Preenchimento Capilar (TPC) que representam o grau de vitalidade do neonato equino (CURCIO; LINS; NOGUEIRA, 2010).

Fowden et al. (2009) sugerem que a eficiência placentária é um índice de adaptação materno fetal e mostra que a placenta pode manter-se funcionalmente e morfolologicamente adaptada para assegurar a demanda de nutrientes para o crescimento fetal. Os mecanismos responsáveis pelas modificações fenotípicas placentárias envolvem sinais nutricionais e hormonais. As mudanças em absoluta e relativa quantidade de nutrientes transferidos para o feto, assim como o resultado do fenótipo alterado da placenta tem grandes consequências na vida adulta e morbidade, embora muitos estudos procurem estabelecer um valor preditivo de eficiência placentária e determinar um fenótipo fisiológico adulto, o prognóstico para indivíduos com placentas eficientes e deficientes provavelmente difere (SIBLEY et al., 2005; FOWDEN et al., 2008).

Assim, Allen et al. (2002a) demonstraram que o peso dos produtos ao nascer é

determinado primariamente pela área total de contato materno fetal do alantocório. O desenvolvimento total dessa área é afetado pelo genótipo materno e fetal, o genótipo materno controla a densidade microcotiledonária, enquanto o genótipo fetal parece ter efeito sobre a área de placenta bruta, provavelmente por influenciar o comprimento do vilo. Contudo mecanismos celulares e moleculares envolvidos no controle do desenvolvimento placentário por meio de genótipos maternos e fetais ainda não são conhecidos.

Assim, deficiências nas funções placentárias podem gerar alterações do crescimento e da maturação fetal, e tais alterações resultarem em neonatos com escore de condição corporal abaixo do esperado. Situação que pode expor o potro a uma série de complicações neonatais, comprometendo seu potencial atlético e rendimento futuro (WESTER, 2009). Além das condições placentárias, outros fatores podem influenciar no tamanho e no peso ao nascer dos potros, como: fatores genéticos, nutricionais e disfunções maternas e fetais (ELLIOTT; MORTON; CHOPIN, 2009).

Muitos estudos epidemiológicos em humanos têm mostrado que o padrão de crescimento fetal é um importante fator de risco para várias doenças degenerativas na vida adulta, principalmente quando se refere à restrições em crescimento uterino, ou fetos pequenos para o tamanho da placenta, aumentam a incidência de hipertensão, isquemia cardíaca e distúrbios metabólicos (BARKER, 1995).

A associação de baixo peso ao nascer e doenças específicas na vida adulta ocorrem independente do peso atual, obesidade ou grau de exercício, mas está ligada a problemas de má nutrição durante a gestação. Algumas observações baseadas em estudos populacionais têm levantado à hipótese que as doenças na vida adulta podem ser originadas na vida fetal assim como anormalidades no fornecimento de nutrientes nos períodos críticos do desenvolvimento (ALLEN et al., 2002a).

Pesquisas foram realizadas sustentando esta hipótese, Robinson, Sinclair e Mcevoy (1999) reduziram a dieta materna durante a gestação, em ruminantes, os mesmos autores em 1979 alteraram o tamanho e capacidade funcional da placenta, diminuindo assim o suprimento nutricional para o feto. Similarmente em ovelhas e ratas, a restrição protéica da dieta durante a gestação, prejudicou o crescimento intrauterino e resultou em adultos hipertensos e com intolerância a glicose (ROBINSON; SINCLAIR; MCEVOY, 2000). Contudo o tempo de vida intrauterina dos animais utilizados como modelo é curto, quando comparado a humanos. Assim, o uso do modelo equino pode ser mais eficiente para investigações de doenças na vida adulta originadas durante a gestação (ALLEN et al., 2002a).

REFERÊNCIAS

- ABD-ELNAEIM, M. M. M.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; LEISER, R. Microvascular architecture of the fetal cotyledons in buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of pregnancy. *Annals of Anatomy, Jena*, v. 185, n. 4, p. 325-334, July. 2003.
- ABD-ELNAEIM, M. M. M.; LEISER, R.; WILSHER, S.; ALLEN WR. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta**, London, v. 27, n. 11-12, p. 1103-1113, Nov.-Dec. 2006.
- AHMED, A.; DUNK, C.; AHMAD, S.; KHALIQ, A. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PIGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen - A Review. **Placenta**, London, v. 21, p. 16-24, Mar-Apr. 2000. Supplement, A.
- ALBERTS, B.; BRADY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Membrane transport of small molecules. In: _____. **Molecular biology of the cell**. New York Garland; 2003. p. 286-314.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 513-527, Apr. 2001.
- ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, p. 623-634, 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. Development in utero. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 445-453, Mar. 2002a.
- ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; STEWART, J.; OUSEY, F.; FOWDEN, A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 237-246, 2002b.
- ALLEN, W. R.; WILSHER, S. Immunohistochemical Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrus cycle and pregnancy. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 516-526, Oct. 2007.
- AMORIM, M. M. A.; SANTOS, C. R. O.; MELO, R. R. C. B.; ROCHA, N. L. F. C.; BARRETO, M. L. M.; AMORIM, M. J. A. A. L. Análise Comparativa das Placentas dos Animais Domésticos. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX, 10., 2010, Recife.

Resumos... Recife: UFRPE, 2010.

AMOROSO, E.C. Placentation. In: Parkers, A.S., **Marshall's Physiology of Reproduction**. London: Longmans, Green and Cp. Ltd, 1952. p.127-311.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. Ed. Manole. 1992. 750 p.

BACON, B. J.; GILBERT, R. D.; KAUFMANN, P.; SMITH, A. D.; TREVINO, F. T.; LOMGO, L. D. Placental anatomy and diffusing capacity in guinea pigs following long-term maternal hypoxia. **Placenta**, London, v. 5, n .6, p. 475-487, Nov./Dec. 1984.

BARKER, D. J. Intrauterine programming of adult disease. **Molecular Medicine Today**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 418–423, Dec. 1995.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIÉNI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to non surgically collect equine embryos at 144, 156 and 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 29, p. 60-62, Dec. 1997. Supplement, 25.

BRACHER, V.; MATHIAS, S.; ALLEN, W. R. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 28, n. 3, p. 180-188, May. 1996.

BRAVO, P. W.; GARNICA, J.; PUMA, G. Cria alpaca body weight and perinatal survival in relation to age of the dam. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n. 2-4, p. 214-219, Apr. 2009.

CAIXETA, E. S.; FAGUNDES, N. S.; CAIXETA, M. S.; PYLES, E. S. S. Desenvolvimento embrionário inicial equino – revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, Lisboa, v. 103, n. 565-566, p. 565-566, Jan./June. 2008.

CASEY, B. M.; MCINTIRE, D. D.; LEVENO, K. J. The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 344, n. 15, p. 467-471. Feb. 2001.

CAVALO DE SALTO. **História dos cavalos**. [2013]. Disponível em: <<http://www.cavalosdesalto.com.br/historiacavalos.html>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

CHARNOCK-JONES, D. S.; CLARK, D. E.; LICENCE, D.; DAY, K.; WOODING, F. B. P. ; SMITH, S. K. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites

at the maternal–fetal interface during gestation in pigs. **Reproduction**, New York, v. 122, n. 5, p. 753–760, Nov. 2001.

CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, C. T. M. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. Molecular Regulation. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, p. 103–113, Feb.-Mar. 2004.

CLARK, D. E.; SMITH, S. K.; SHARKEY, A. M.; CHARNOK JONES, D. S. Localization of VEGF and expression of its receptors flt-1 and KDR in human placenta throughout pregnancy. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 1090–1098, May. 1996.

COAN, P. M.; ANGIOLINI, E.; SANDOVICI, I.; BURTON, G. J.; CONSTANCIA, M.; FOWDEN, A. L. Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 586, n. 18, p. 4567-4576, July. 2008.

COTTRILL, C. M.; JEFFERS-LO, J.; OUSEY, J. C.; MCGLADDERY, A. J.; RICKETTS, S. W.; SILVER, M.; ROSSDALE, P. D. The placenta as a determinant of fetal wellbeing in normal and abnormal pregnancies. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 591–601, 1991. Supplement.

CURCIO, B. R.; LINS, L. A.; NOGUEIRA, C. E. W. Parto III. In: NOGUEIRA, C. E. W.; LINS, L. A. **Neonatologia e pediatria equina**. Pelotas: editora gráfica Universitária da UFPel, 2010. p. 50-80.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J.A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, New York, v. 255, n. 5047, p. 989–99, Feb 1992.

DISALVO, J.; BAYNE, M. L.; CONN, G.; KWOK, P. W.; TRIVEDI, P. G.; SODERMAN, D. D.; PALISI, T. M.; SULLIVAN, K. A.; THOMAS, K. A. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor. Placenta growth factor heterodimer. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 7717-7723, Mar. 1995.

DON, A. Samuelson. **Tratado de Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 455-459, 2007. p. 544.

DWYER, C. M.; CALCERT, S. K.; FARISH, M.; DONBAVAND, J.; PICKUP, H. Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the neonatal behavior of the lamb. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 4, p. 1092-1110, Mar. 2005.

ELLIOTT, C.; MORTON, J.; CHOPIN, J. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 4, p. 683–689, Mar. 2009.

EQUINOCULTURA. **Puro Sangue Inglês**. [2013]. Disponível em: <<http://www.equinocultura.com.br/c/26>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

FÁTIMA, L. A.; PAPA, P. C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): Regulação Transcricional e Pós-Transcricional. **Revista de Biologia**, São Paulo, v. 4, p. 22-27, Jun. 2010.

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

FONG, G. H.; ROSSAN, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine Kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, London, v. 376 (6535), n. 6, p. 66-70, Jul. 1995.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, n. 5, p. 515-526, May. 2004.

FOWDEN, A. L.; WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FORHEAD, A. J.; CONSTANCIA, M. Programming placental nutrient transfer capacity. **Journal of Physiology**, Cambridge, n. 1, v. 572, p. 5–15, Apr. 2006.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J.; COAN, P. M.; BURTON, G. J. The placenta and intrauterine programming. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 20, n. 4, p.439–450, Feb. 2008.

FOWDEN, A. L.; SFERRUZZI-PERRI, A. N.; COAN, P. M.; CONSTANCIA, M.; BURTON, G. J. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 14, p. 3459-3472, Jul. 2009.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2^a ed. Madison, Wisconsin: Equiservices, 1992, 642 p.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 19, n. 4, p. 603-611, Apr. 1983.

GINTHER, O. J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 17, n. 3, p. 41-47, Mar. 1985.

HAY, M. F.; ALLEN, W. R. An ultrastructural and histochemical study of the interstitial cells in the gonads of the fetal horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 23, p. 557–561, Oct. 1975. Supplement.

HAY, V. W. Regulation of placental metabolism by glucose supply. **Reproduction Fertility Development**, East Melbourne, v. 7, n. 3, p. 365-375, 1994.

HOLTAN, D. W.; HOUGHTON, E.; SILVER, M.; FOWDEN, A. L.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D. Plasma progestagens in the mare fetus and newborn foal. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 517–528, 1991. Supplement.

JONES, H. N.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Regulation of placental nutrient transport – a review. **Placenta**, London, v. 28, n. 8-9, p. 763–774, Aug.-Sep. 2007.

LADOUX, A.; FRELIN, C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 195, n. 2, p. 1005–1010, Sep.1993.

LANGE, T.; GUTTMANN-RAVIV, N.; BARUCH, L.; MACHLUF, M.; NEUFELD, G. VEGF162, a new heparina-binding vascular endotelial growth factor splice from that is expressed in transformed human cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 17164-17169, 2003.

LAROUSSE dos cavalos. São Paulo, SP: Larousse do Brasil, 2006.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, Baltimore, v. 109, n. 3, p. 122-134, 1994.

LEISER, R.; BREBS, C.; EBERT, B.; DANTZER, V. Placental vascular corrosion cast studies: comparison between ruminants and human. **Microscopy Research Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 76-87, July. 1997.

LUDWING, S.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; VON REISWITZ, A.; SCHOON, H-A. Angiopathies in the equine endometrial biopsy – a marker for extrauterine vascular lesions? **Pferdeheilkunder**, Germany, v. 17, n. 6, p. 608-14, Nov./Dec. 2001.

LYALL, F.; YOUNG, A.; BOSWELL, F.; KINGDOM, J. C. P.; GREER, I. A. Placental Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Placentae from Pregnancies Complicated by Pre-eclampsia and Intrauterine Growth Restriction does not Support Placental

Hypoxia at Delivery. **Placenta**, London, v. 18, n. 4, p. 269-276, May. 1997.

KAZI, A. A.; JONES, J. M.; KOSS, R. D. Chomatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 19, n. 8, p. 2000-2019, Mar. 2005.

KLAUBER, N.; ROHAN, R. M.; FLYNN, E.; D'AMATO, R. J. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. **Nature Medicine**, New York, v. 3, n. 4, p. 443-446, Apr. 1997.

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**, London, v. 21, n. 5-6, p. 565-574, July./Aug. 2000.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; PECK, L. J.; CHEVES, L.L. Effect of restricted conceptus mobility on maternal recognition of pregnancy in mares. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 3, n. 53, p. 23-24, 1985. Supplement.

MAYHEW, T. M.; CHARNOCK JONES, D. S.; KAUFMANN, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, p.127-139, Feb./Mar. 2004.

MEIRELLES, M. G.; SERRANO, E. C. R.; QUEIROZ SILVA, J. C.; BARBOSA, R.; COSTA NETO, J. B. F.; MAIORKA, P. C.; FERNANDES, C. B. Comparison of neonatal, placental and maternal parameters of mini horse foals born from a mangalarga type recipient mare and a mini horse recipient mare. In: CONGRESSO ARGENTINO DE REPRODUCCIÓN EQUINA, 2., 2011, Rio Cuarto Argentina. **Resúmenes**.... Rio Cuarto, Argentina, 2011. p. 89-91.

OWENS, J. A.; FALCONER, J.; ROBINSON, J. S. Glucose metabolism in pregnant sheep when placental growth is restricted. **Animal Journal Physiology Regulatory and Comparative Physiology**, v. 257, n. 2, p. 350-357, Aug. 1989.

PARK, J. E.; CHEN, H. H.; WINER, J.; HOUCK, K. A.; FERRARA, N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1-I/KDR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, Oct. 1994.

PASHEN, R. L.; ALLEN, W. R. Endocrine changes after foetal gonadectomy and during normal and induced parturition in the mare. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 2, n. 1-3, p. 271-288, June. 1979a.

PASHEN, R. L.; ALLEN, W. R. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 27, p. 499–509, 1979b. Supplement.

PASHEN, R. L.; SHELDRIK, E. L.; ALLEN, W. R.; FLINT, A. P. F. Dehydro-epiandrosterone synthesis by the fetal foal and its importance as an oestrogen precursor. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 32, p. 389–397, 1982. Supplement.

PAPA, P. C.; MOURAL, C. E. B.; FÁTIMA L. A.; CAMPOS, D. B.; MARQUES, J. R. J. E. B.; BARUSELLI, P. S.; BINELLE, B. M.; PFARRER, C.; LEISER, R. VEGF system expression in different stages of oestrus cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 33, n. 4, p. 379–389, Nov. 2007.

REYNOLDS, L. P.; CATON, J. S.; REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; VONNAHME, K. A.; BOROWICZ, P. P.; LUTHER, J. S.; WALLACE, J. M.; WU, G.; SPENCER, T. E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies, **The Journal of Physiology**, Leningrad, v. 572, n. 1, p. 51–58, Apr. 2006.

RICE, G. Mechano-transcription pathways involved in determining placental size. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 30, p. 457, 1998. Abstract.

ROBERTS, C. T.; SOHLSHOM, A.; KIND, K. L.; EARL, R. A.; KHONG, T. Y.; ROBINSON, J. S.; OWENS, P. C.; OWENS, J. A. Maternal food restriction reduces the exchanges surface area and increases the barrier thickness of the placenta of the guinea pig. **Placenta**, London, v. 22, n. 2–3, p. 177–185, Feb./Mar. 2001.

ROBINSON, J. J.; SINCLAIR, K. D.; MCEVOY, T. G. Nutritional effects on fetal growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 315–331, 1999.

ROBINSON J. S.; MOORE, V. M.; OWENS, S. A. MCMILLAN, F. C. Origins of fetal growth restriction **European Journal of Obstetrics and Gynaecology Reproduction Biology**, v. 92, n. 1, p. 13–19, Sept. 2000.

RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra-som em equinos**. 2006. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C.; SILVER, M.; FOWDEN, A. Studies on equine prematurity 6: guidelines for assesment of foal maturity. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 16, n. 4, p. 300–302, July. 1984.

SALAFIA, C. M.; ZHANG, J.; MILLER, R. K.; CHARLES, A. K.; SHROUT, P.; SUN, W. Placental growth patterns affects birth weight for given placental weight. **Birth defects research - Part A - Clinical and molecular teratology**, Hoboken, v. 79, n. 4, p. 281-288, Apr. 2007.

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

SAMUEL, C.A.; ALLEN, W.R.; STEVEN. D. H. Studeis on the equine placenta. II. Ultrastructure of the placental barrier. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 48, p. 256-264, 1976.

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

SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; MIYAMOTO, A. Stimulatory and synergistic effect of luteinising hormone and insulin like growth factor-1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of culture bovine granulosa cells. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**. Heidelberg, v. 109, n. 3, p. 155-162, 2001.

SHALABY, F.; ROSSANT, J.; YAMAGUCH, T. P.; GERTSENSTEIN, M.; WU, X. F.; BREITMAN, M. L.; SCHUH, A. C. Failure of blood island formation and vasculogenesis in *Klk-1* deficient mice. **Nature**, New York, v. 376, n. 6, p. 62-66, July, 1995.

SHIBUYIA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*Flt*) closely related to the *fms* family. **Oncogenese**, v. 5, n. 4, p. 519-524, Apr. 1990.

SGAMBATI, E.; MARINI, M.; ZAPPOLI, G. D.; THYRION, E. P.; MELLO, G.; ORLANDO, C.; SIMI, L.; TRICARICO, C.; GHERI, G.; BRIZZIA, E. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Baltimore, v. 111, n. 6, p. 564-570, June. 2004.

SIBLEY, C. P.; TURNER, M. A.; CETIN, I.; AYUK, P.; BOYD, C. A. R.; D'SOUZA, S.W.; GLAZIER, T. C.; GREENWOOD, S. L.; JANSON, T.; POWELL, T. L. Placental phenotypes of intrauterine growth. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 58, n. 5, p. 827-832, Nov. 2005.

SILVA, L. A.; KLEIN, C.; EARLY, A. D.; SHARP, C. D. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: a anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factors receptor system immunolocalization and gene expression study. **Reproducton Research**, v. 142, n. 4, p. 593-603, 2011.

STEWART, F.; ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. Pregnant mare serum gonadotrophin ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. **Journal Endocrinology**, London, v. 71, n. 3, p. 371-382, 1976.

STEVEN, D. H.; SAMUEL, C. F. Anatomy of the placental barrier in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Oxford, v. 23, p. 579-582, Oct. 1975.

SKINNER, H. A. **The origin of medical terms**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1961. p. 328.

STOUFFER, R. L.; MARTINES-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A.; XU, F. HAZZARD, M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Archives of Medical Research**, México, v. 32, n. 6, p. 567-575, Nov./Dec. 2001.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E2 and F2 alfa production by equine conceptuses and concetrations in conceptus fluids and uterine flushing recovered from early pregnant and diestrous mares. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 2, 2002.

TAIT, A. D.; SANTIKARN, L. C.; ALLEN, W. R. Identification of 3-hydroxy-5,7 pregnandien-20-one and 3-hydroxy-5,7 androstadien-17-one as endogenous steroids in the foetal horse gonad. **Journal of Endocrinology**, London, v. 99, p. 87-92, 1983.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITRIOV, D.; GOSPODAROWICZ, D. C.; BOHLEN, P. Identification of KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, Sep. 1992.

THORBURN, G. D. A speculative view of parturition in the mare. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 25, p. 41-49, Apr. 1993. Supplement, 14.

TISCHNER, M. Development of Polish-pony foals born after embryo transfer to large mares. **Journal Reproductive Fertility**, v. 21, p. 62-62, Aug. 1989. Supplement 8.

TORRY, D. S.; HINRICHS, M.; TORRY, R. J. Determinants of placental vascularity. **American Journal of Reproductive Immunology**. New York, v. 51, n. 4, p. 257-268, Apr.

2004.

TORRY, D. S.; LEAVENWORTH, J.; CHANG, M.; MAHESHWARI, V.; GROESCH, K.; BALL, E. R.; TORRY, R. J. Angiogenesis in implantation. **Journal of assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 24, n. 7, p. 303-315, July. 2007.

TROEDSSON, M.; SAGE, A. M. Fetal/Placental Evaluation in the Mare. In: BALL, B. A. (ed.) **Recent Advances in Equine Reproduction**. Ithaca, New York, USA. International Veterinary Information Service, 2001.

VALLET, J. L.; FREKING, B. A. Differences in placental structure during gestation associated with large e small pig fetuses. **The Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 3267-3275, Aug. 2007.

VAUGHAN, O. R.; FOWDEN, A. L.; COAN, P. M. Morphological adaptations of the mouse placenta with maternal undernutrition. Trabalho apresentado em: The Physiological Society, 2008, University of Cambridge. **Proceedings...** Cambridge, England. v. 11, p. 12, 2008.

VERONESI, M. C; VILLANI, M.; WILSHER, S.; CONTRI, A.; CARLUCCIO A. A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. **Theriogenology**, Stoneham , v. 74, n. 4, p. 627-631, Sept. 2010.

VONNAHME, K. A.; WILSON, M. E.; FROD, S. P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 6, p.1821-1825, June, 2001.

VOURELA, P.; HATVA, E.; LYMBOUSSAKI, A.; KAIPAINEN, A.; JOUKOV, V.; PERSICO, M. G.; ALITALO, K.; HALMESMAKI, E. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Human Placenta. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 56, n. 2, p. 489-494, Feb. 1997.

VUCKOVIC, M.; PONTING, J.; TERMAZ, B. I.; NIKETIC, V.; SEIF, M. W.; KUMAR, S. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. **Journal of Anatomy**, London, v. 188, n. 2, p. 361–366, Apr. 1996.

YAMAMOTO, O.; ASAI, Y.; KUSUNOSE, R. Effects of sex, birth month, parity, weight of dam and farm on the growth of Thoroughbred foals and yearlings. **Animal Science and Technology**, Tokyo, v. 64, n. 5, p. 491-498, May. 1993.

YANCOPOULOS, C. D.; DAVIS, S.; GALE, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, A. J.;

HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, New York, v. 407, p. 242-248, Sept. 2000.

WALT, M. L.; STABENFELDT, J. P.; HUGHES, D. P.; NEELY, D. P.; BRADBURY, R. Development of the equine ovary and ovulation fossa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 471-477, 1979. Supplement.

WESTER, N. **Associations between placental parameters, mare and foal body condition score at birth, and foal health in the first month of life**. 2009. (Tese de Douorado). Universiteit Utrecht. Disponível em: <<http://igitur-archive.library.uu.nl/student-theses/2010-0211-200256/UUindex.html>>. 2009. Acesso em: jul. 2011.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER. HAVEMEYER FOUNDATION, 5., 2000, Saari, Finland. **Proceedings...** Saari, Finland, 2000. p. 74-75.

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

WILSON, M. E.; FORD, S. P. Comparative aspects of placental efficiency. **Reproduction**, v. 58, p. 223-232, June. 2001. Trabalho apresentado: VI Proceedings of the Sixth International Conference on Pig Reproduction held. University of Missouri-Columbia, USA. **Supplement**.

WINTHER, H.; DANTZER, V. Co-Localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors Flt-1 and KDR in the mink placenta. **Placenta**, London, v. 22, n. 5, p. 457-465, 2001.

WOODING, F. B. P.; BURTON, G. J.; **Comparative Placentation: Structure, Function and Evolution**. Springer-Verlag, Heidelberg, 2008. p. 293.

3 HIPÓTESE

A pluriparidade na espécie equina influencia positivamente o peso do potro ao nascimento, por meio de uma maior eficiência placentária.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAIS

- Avaliar a influência do número de partos sob a morfologia das diferentes regiões da membrana corioalantóide, mensurar a eficiência placentária bem como identificar e quantificar a expressão do VEGF e seus receptores, com potencial angiogênico na membrana corioalantóide a termo de éguas e correlacionar os resultados com o peso de potros neonatos da raça Puro Sangue Inglês.

4.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do número de partos sob a eficiência placentária e a morfometria das macro e microrregiões, em três diferentes regiões da membrana corioalantóide a termo de éguas (corpo do útero, corno uterino gestante e corno uterino contralateral) e correlacionar os resultados com o peso de potros neonatos da raça Puro Sangue Inglês.
- Avaliar a influência do número de partos sob a expressão/quantificação do VEGF e seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/FLK-1 em três regiões da membrana corioalantóide a termo de éguas (corpo do útero, corno uterino gestante e corno uterino contralateral) da raça Puro Sangue Inglês.
- Correlacionar os resultados da avaliação estereológica da membrana corioalantóide com as variáveis maternas, paternas e neonatais na busca de relações práticas com as variáveis biométricas e de vitalidade do neonato equino da raça Puro Sangue Inglês.

RESUMO

GUIMARÃES, C.F. **Eficiência placentária na espécie equina: influência da pluriparidade sobre a morfometria, angiogênese e peso dos potros ao nascimento.** [Placental efficiency in equine species: influence on parity, morphometry, angiogenesis in foal birthweights] 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Objetivou-se, neste estudo, avaliar a influência do número de partos sob a eficiência placentária. Buscando, por meio da morfometria das macro e microrregiões, além da expressão do VEGF e seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/FLK-1 na membrana corioalantóide a termo, dados referentes à inter-relação da pluriparidade, contato materno fetal e peso ao nascimento dos neonatos da raça Puro Sangue Inglês. O delineamento experimental consistiu em um estudo analítico, observacional, transversal, prospectivo. Foram acompanhados cinquenta partos. Como critério de inclusão foram selecionadas apenas as fêmeas que apresentaram eutocia. As fêmeas foram divididas de acordo com a pluriparidade em três grupos, primíparas (n=18), 2 a 5 partos (n=14) e 6 a 10 partos (n=18). As membranas corioalantóides foram recolhidas após o delivramento, pesadas, dispostas formando a letra "F" e fotografadas. Foram coletados fragmentos de três cm² correspondente às regiões do corpo do útero (Cut), corno uterino gestante (CG) e corno uterino contralateral (CnG) e fixados em formol. Após processamento foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina e Picro-Sirus-Red. O estudo imunohistoquímico foi realizado pelo método avidina-biotina. A análise estereológica foi realizada ao microscópio óptico, para determinar a composição volumétrica dos diferentes compartimentos da placenta juntamente com as áreas de superfície de contato materno-fetal. Foi observado que quanto maior o número de partos maior é o peso do potro. A avaliação morfofuncional da placenta evidenciou que o aumento da paridade é determinante para ganho de eficiência placentária. As membranas corioalantóides das éguas pluríparas tenderam a apresentar maior volume total do compartimento gestante, aumento na porcentagem e volume total de vilos, além de maior densidade microcotiledonária e expressão do VEGF na região do CG da membrana corioalantóide a termo.

Palavras-chave: Placenta. Neonato. VEGF. Estereologia. Puro Sangue Inglês.

ABSTRACT

GUIMARÃES, C.F. Placental efficiency in equine species: influence on parity, morphometry, angiogenesis in foal birthweights. [**Eficiência placentária na espécie equina: influência da pluriparidade sobre a morfometria, angiogênese e peso dos potros ao nascimento**] 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to evaluate the influence of parity on the placental efficiency. To assess macro and microscopic area morphometry, and expression of VEGF and its receptors (VEGFR-1/Flt-1 and VEGFR-2/FLK-1) at allantochorion, data regarding the interrelationship of parity, fetomaternal contact and birth weight foal Thoroughbred. The experimental study consisted of an analytical, observational, cross-sectional, prospective study. The term placentas were collected at a third stage from spontaneous labour of fifty Thoroughbred mares. Inclusion criteria were selected only females that had eutoccy. The mares were divided according to parity into three groups primiparous (n = 18) multiparous 2 to 5 deliveries (n = 14) and multiparous 6 to 10 deliveries (n = 18). The allantochorion were weighed and spread out in typical 'F' configuration with the fetal (allantoic) surface outermost. A sample of the allantochorion was taken from one of each region, the body of the uterus (UB), pregnant uterine horn (PH) and contralateral uterine horn (CtB) and fixed in formal saline. After processing technique were stained with hematoxylin & eosin and Sirius - Red - Picro. Immunohistochemical localization for VEGF and their receptors was performed by the avidin - biotin method. The analysis was conducted under a light microscopy to determine the volumetric composition of the different placenta compartments, surface density of the microcotyledons and the total microscopic area of fetomaternal contact were calculated stereologically. It was observed that parity is the highest relation with birth weight. The morphofunctional evaluation of the placenta showed that increasing parity is critical to placental efficiency gains. Multiparous mares tended to have higher total volume compartment pregnant, percentage increase in total villi volume, higher microcotyledon density and VEGF expression in the chorioallantoic membrane at PH region.

Key-Words: Placenta. Parity. VEGF. Stereology. Thoroughbred.

EFICIÊNCIA PLACENTÁRIA NA ESPÉCIE EQUINA: INFLUÊNCIA DA PLURIPARIDADE SOBRE A MORFOMETRIA, ANGIOGÊNESE E PESO DOS POTROS AO NASCIMENTO

5 INTRODUÇÃO

A eficiência placentária fornece indicações das condições *in utero* e das adaptações no desenvolvimento feto-placentário ocorridas para satisfazer as exigências do crescimento fetal (FOWDEN et al., 2009).

A eficiência é comumente definida como gramas de feto produzidas por gramas de placenta (WILSON; FORD, 2001). Assim, deficiências nas funções placentárias podem gerar alterações do crescimento e da maturação fetal, tais alterações resultam em neonatos com escore de condição corporal abaixo do esperado. Situação que pode expor o potro a uma série de complicações neonatais, comprometendo seu potencial atlético e rendimento futuro (WESTER, 2009).

Em humanos as mudanças em quantidade absoluta e relativa de nutrientes transferidos para o feto, assim como o resultado do fenótipo alterado da placenta tem grandes consequências na vida adulta e índices de morbidade, embora muitos estudos tentem estabelecer um valor preditivo de eficiência placentária e determinar um fenótipo fisiológico adulto, o prognóstico para indivíduos com placentas eficientes e deficientes provavelmente diferem (SIBLEY, 2005; FOWDEN et al., 2008).

A literatura considera estreita a relação entre falhas placentárias e viabilidade do neonato equino. Algumas observações baseadas em estudos populacionais têm levantado à hipótese que as doenças na vida adulta podem ser originadas na vida fetal em consequência a anormalidades no fornecimento de nutrientes nos períodos críticos do desenvolvimento (BARKER, 1995; ALLEN et al., 2002b).

Acredita-se que a eficiência placentária diminua com o avanço da idade das éguas, devido a menor área de troca placentária em resposta a degenerações ou disfunções das glândulas endometriais (LUDWING et al., 2001).

Na reprodução equina é uma realidade trabalhar com fêmeas mais velhas e provadas para produção de material genético de alta qualidade. Contudo, a paridade parece ser mais importante para determinação do peso ao nascer do produto do que a idade materna, isso

devido à redução das microestruturas placentárias e expressão de fatores angiogênicos, diminuindo assim a área válida para trocas hemotróficas de nutrientes e gases (WILSHER; ALLEN, 2000).

Aventa-se que pluriparidade na espécie equina influencia positivamente o peso do potro ao nascimento, por meio de uma maior eficiência placentária. Para testar tal hipótese buscamos avaliar a influência do número de partos sob a eficiência placentária por meio da morfometria das macro e microrregiões, além da expressão do VEGF e seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 na membrana corioalantóide a termo de éguas, a fim de estabelecer relação com peso ao nascimento dos neonatos da raça Puro Sangue Inglês.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 POPULAÇÃO ANALISADA E AMOSTRAS

O delineamento do estudo consistiu em um estudo analítico, observacional, transversal, prospectivo. Foram acompanhados cinquenta partos de éguas da raça Puro Sangue Inglês, entre os meses de julho a dezembro de 2012, em um haras localizado na região de Bagé, no estado do Rio Grande do Sul (latitude $-31^{\circ}19'5''$, longitude $-54^{\circ}06'25''$). Como critério de inclusão foram selecionadas apenas as fêmeas que apresentaram eutocia. As fêmeas foram divididas de acordo com a pluriparidade em três grupos, primíparas ($n=18$), 2 a 5 partos ($n=14$) e 6 a 10 partos ($n=18$).

6.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Dados da Égua: a idade e número de partos foram obtidos das fichas zootécnicas de cada animal.

Dados placentários: As membranas corioalantóides foram recolhidas imediatamente após o delivramento. Foram pesadas em balança convencional e dispostas sobre uma superfície plana, convencionalmente formando a letra "F" e fotografadas com escala para posteriores aferições de sua área de superfície (Figura 1A). Foram coletados, em duplicata, fragmentos de três cm^2 do corioalantóide, correspondente às regiões do corpo do útero (Cut), corno uterino gestante (CG) e corno uterino contralateral (CnG), fixados por imersão em formol a 10% à temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente os fragmentos foram mantido em álcool 70% até as avaliações histológicas/imunohistoquímicas. As membranas corioalantóides foram amostradas utilizando-se um método randômico sistemático e uniforme em multi-estágios [systematic uniform random (SUR) design] (MAYHEW et al., 2008).

Os fragmentos de tecido de cada região placentária foram processados e incluídos em parafina de forma que cortes perpendiculares (cortes verticais) a superfície coriônica (plano horizontal) fossem obtidos. Este protocolo de amostragem tem a vantagem de randomizar o local de secção e orientação, sendo ambos necessários para se estimar as áreas de superfície

juntamente com o volume dos tecidos (HOWARD; REED, 2005; MAYHEW et al., 2008).

Posteriormente os blocos foram cortados com auxílio de um micrótomo rotativo, duas séries de cinco cortes com espessura de cinco micrometros (μm), selecionados randomicamente, os cortes foram coletados em lâminas comuns e corados segundo método padrão de Hematoxilina & Eosina (HE) e Picro-Sirus-Red (PSH). Outros cinco cortes randômicos de três μm de espessura foram coletados em lâminas silanizadas, para o estudo imunohistoquímico.

Dados do potro: Logo após o nascimento foi aferido o peso por meio de balança convencional.

6.3 AVALIAÇÃO ESTEROLÓGICA

A análise estereológica foi realizada ao microscópio óptico. O objetivo foi estimar a composição volumétrica dos diferentes compartimentos da membrana corioalantóide juntamente com as áreas de superfície de contato materno-fetal.

Neste estudo, as avaliações estereológicas utilizadas foram adaptadas do método descrito por Allen et al. (2002a) e Veras et al. (2008).

6.3.1 Volume Total da Membrana corioalantóide

O volume total da membrana corioalantóide (V_{plac} , cm^3) foi obtido dividindo-se o peso da membrana corioalantóide (g) pela densidade específica do tecido (D^1 , g/cm^3), neste estudo considerada $1,05\text{g}/\text{cm}^3$ conforme padronizada por Mayhew et al. (2003), para tecidos menos densos como é o caso da membrana corioalantóide equina.

¹ * $D = m/v$, onde m é o peso em gramas e v o volume em cm^3 .

6.3.2 Volume das Zonas Placentárias

Os volumes das zonas placentárias: Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Estrela Cervical (EC) foram determinados pelo método da contagem de pontos como descrito por Howard e Reed (2005). Neste método um sistema teste de pontos foi aplicado sobre a membrana corioalantóide, os pontos incidentes sobre cada uma das zonas foram contados e aplicando-se a fórmula (a) a seguir as frações de volume de cada área foram obtidas:

$$(a) V_{v \text{ area}} = \sum pt_{\text{area}} / \sum pt_{\text{plac}}$$

onde $\sum pt_{\text{area}}$ é a soma de todos os pontos incidentes sobre a zona de interesse e $\sum pt_{\text{plac}}$ é a somatória de todos os pontos incidentes sobre a membrana corioalantóide (Figura 1B).

O volume total de cada zona foi obtido multiplicando-se a fração de volume de cada zona pelo volume total da membrana corioalantóide (b):

$$(b) V_{\text{area}} = V_{v \text{ area}} \times V_{\text{plac}}$$

Figura 1 - (A) Identificação das zonas da membrana corioalantóide a termo de éguas após o delivramento. Fotografia em formato “F”. A: estrela cervical, B: Corno Gestante (CG), C: Bifurcação dos cornos, G: Corpo do útero (Cut), D: Corno Não Gestante (CnG), E: Membrana amniótica. (B) Mensuração do volume das zonas placentárias com o auxílio do *software* Image J®

Fonte: Allen et al. (2002a) adaptação de Guimarães, C. F. (2013).

6.3.3 Composição volumétrica dos compartimentos teciduais da membrana corioalantóide nas diferentes regiões placentárias

Para se estimar os volumes do córion, dos microcotilédones, do mesoderma alantóide e dos vasos do alantóide os cortes foram escaneados com o auxílio do equipamento Panoramic SCAN® com objetiva Zeiss Plan-Apochromat 20x NA 0,80, câmera Zeiss AxionCam MRm 1388x1040 pixels, com imagem obtida com foco expandido 5:2. Foram fotografados utilizando-se uma objetiva de pequeno aumento (2X) de maneira que o corte todo pudesse ser visualizado com o auxílio do *software* Panoramic Viewer® (Figura 2A). Cinco campos por amostra foram analisados.

A fração de volume (V_v) de cada compartimento da membrana corioalantóide [córion (C), microcotilédone (M), Mesoderma alantóide (Ma) e vasos do alantóide (V)] foi estimada pelo método de contagem de pontos (HOWARD; REED, 2005) (Figura 2B). Um sistema teste de área associada a cada ponto de 100 mm² foi sobreposto nos cortes orientados verticalmente. O *software* Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)² foi utilizado para a realização das contagens e geração dos sistemas teste (Figura 3). Os pontos incidentes sobre os diferentes compartimentos placentários (P_{comp}) e sobre a membrana corioalantóide como um todo (P_{plac}), foram contados e a fração de volume (V_v) dos compartimentos estimados usando-se a seguinte equação (c):

$$(c) \quad V_{vcomp} = \Sigma P_{comp} / \Sigma P_{plac}$$

onde ΣP_{comp} e ΣP_{plac} são a soma de todos pontos em todos os campos e cortes de cada membrana corioalantóide.

Subsequentemente, o volume total de cada zona da membrana corioalantóide (V_{zona}) foi estimado multiplicando-se a fração de volume (V_v) pelo volume da zona da membrana corioalantóide correspondente (V_{plac}) segundo a fórmula (d):

$$(d) \quad Est V_{zona} = V_v \times V_{plac}$$

² ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>)

Figura 2 - (A) Compartimentos da membrana corioalantóide a termo de éguas: microcotilédone (M), córion (C), Mesoderma alantóide (Ma) e vasos do alantóide (V). Imagem histológica do CnG. Coloração HE. Aumento de 2x. (B) Estimativa do córion (C), microcotilédone (M), Mesoderma alantóide (Ma) e vasos do alantóide (V) da região do CG. Geração de sistemas teste com o auxílio do software Image J®. Coloração HE. Aumento 2x

(GUIMARÃES, C.F., 2013).

6.3.4 Densidade, altura e comprimento dos microcotilédones

A altura e o comprimento dos microcotilédones foram obtidos por meio de mensuração direta na fotomicrografia escaneada pelo equipamento Panoramic SCAN®, com o auxílio do *software* Panoramic Veiwer® conforme figura 3. A densidade microcotiledonária foi estimada pelo número de microcotilédones presentes em uma determinada unidade de comprimento da membrana corioalantóide (Figura 3).

Figura 3 - Mensuração do número, altura (a) e comprimento da base (b) dos microcotiledões, com auxílio do software J® em fotomicrografia escaneada pelo equipamento Panoramic SCAN®, com o auxílio do software Panoramic Veiw®. Número de vilos (1, 2) por unidade de comprimento (linha preta). Coloração HE. Aumento de 2x

(GUIMARÃES, C.F., 2013).

6.3.5 Composição tecidual dos microvilos da membrana corioalantóide nas diferentes regiões placentárias

A avaliação da composição tecidual dos microvilos da membrana corioalantóide foi realizada também pelo método de contagem de pontos. O objetivo desta avaliação foi verificar se há diferenças quanto ao volume de capilares fetais, bem como dos demais tecidos que o constituem, a saber: mesênquima (mesoderme alantóidiana) e epitélio corial (trofoblasto). Para tanto, os cortes corados pelo método Picro-Sírius, fotografados utilizando o *software* AxionVision® em câmera Axion Cam MRc5 da Zeiss, no microscópio Leica HC modelo DMR, foram utilizados 10 campos aleatórios fotografados com objetiva de grande aumento (40x) (Figura 4A).

Da mesma forma como descrito anteriormente, um sistema teste de área associado a cada ponto de $100 \mu\text{m}^2$ foi sobreposto nos cortes e os pontos incidentes sobre os diferentes tecidos (P_{tec}) e sobre os microvilos como um todo (P_{mvl}), foram contados e a fração de volume (V_V) dos tecidos estimados usando-se a seguinte equação (c):

$$(c) \quad V_{V_{\text{tec}}} = \Sigma P_{\text{tec}} / \Sigma P_{\text{mvl}}$$

onde ΣP_{tec} e ΣP_{mvl} são a soma de todos pontos em todos os campos e cortes de cada membrana corioalantóide.

Subsequentemente, o volume total de cada compartimento tecidual dos microvilos (V_{tec}) foi estimado multiplicando-se a fração de volume pelo volume total dos microcotilédones nas diferentes zonas placentárias (V_M) segundo a fórmula (d):

$$(d) \quad V_{tec} = V_{V_{tec}} \times V_M.$$

6.3.6 Área de superfície de contato materno fetal

As densidades de superfície de contato materno fetal foram obtidas utilizando-se um sistema teste de arcos ciclóides sobreposto em 10 campos aleatórios fotografados com objetiva de médio aumento (10x), de modo que seu eixo vertical correspondesse com a direção vertical dos cortes de tecido determinada pela superfície coriônica (BADDELEY; GUNDERSEN; CRUZ-ORIVE, 1986; COAN et al., 2008) (Figura 4B).

Figura 4 - (A) Fotomicrografia obtida com auxílio do software Image J®, para estimativa da composição tecidual dos microvilos da membrana corioalantóide a termo na espécie equina. Capilares fetais (a), mesênquima (b) e epitélio coreal (c). Coloração Picro-Sírius-Red. Objetiva de 40x. (B) Contagem das intersecções entre os arcos ciclóides e os vilos, para estimativa da área de superfície dos vilos da membrana corioalantóide a termo na espécie equina. Geração de sistemas teste com o auxílio do software Image J®. Coloração HE. Aumento de 10x

(GUIMARÃES, C.F., 2013).

As intersecções entre os arcos testes e os limites dos vilos foram contados e somados em todos os campos para cada membrana corioalantóide. A equação (e) que se segue foi usada

para se estimar a densidade de superfície (S_V) da membrana corioalantóide:

$$(e) \quad \text{Est } S_V = 2 \times \Sigma I_{\text{surf}} / (l_p \times \Sigma P_M)$$

onde ΣI_{surf} é o número total de intersecções entre os arcos ciclóides e a superfície do compartimento, l_p é o comprimento da linha teste (42.4 μm na escala da imagem) associada a cada ponto e ΣP_M é o número total de pontos que incidem sobre o compartimento de referência (neste caso a membrana corioalantóide).

As áreas de superfície absolutas (S_{surf}) foram obtidas multiplicando-se a densidade de superfície (S_V) pelo volume dos microcotilédones (soma dos volumes totais nas diferentes zonas placentárias) da segundo a equação (f):

$$(f) \quad \text{Est } S_{\text{surf}} = S_V \times V_M$$

6.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Desparafinização: As lâminas foram colocadas em xilol a quente, em estufa à 60 – 65° C, durante 20 minutos. Após foram passadas rapidamente em três banhos de xilol frio.

Hidratação: As lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto. Um banho de álcool 95°. Um banho de álcool 70°. Colocadas por três minutos em banho de ácido fórmico puro. Lavadas em água corrente. Após foram lavadas com água deionizada.

Recuperação antigênica: A recuperação dos antígenos foi determinada após padronização dos anticorpos em alta temperatura por um minuto à 125°C, utilizando tampão Citrato pH 6.

Bloqueio da peroxidase endógena: As lâminas foram colocadas em água oxigenada 10 Volumes (3%) durante cinco minutos, a operação foi repetida por cinco vezes. Posteriormente lavadas em água corrente e três vezes em PBS, por cinco minutos.

Bloqueio de IgG inespecíficas: As lâminas foram colocadas em banho de caseína 2,5% por cinco minutos, para bloqueio de reações inespecíficas.

Incubação com os anticorpos: Os anticorpos primários foram previamente titulado em BSA. As lâminas foram secadas ao redor dos cortes. Pipetou-se os anticorpos diluídos sobre os cortes, utilizando-se uma micropipeta. Incubaram-se as lâminas em câmara úmida,

deixando em geladeira *overnight*, (18 – 20 horas), com os anticorpos primários: VEGF na diluição de 1:600 (Novus Biologicals Antibody United States, Colorado, United States - NB100-698), anti-Flt-1 na diluição de 1:400 (Thermo Scientific Pierce Antibodies, Rockford, Illinois, United States - PA5-16493) e Flk-1(KDR) na diluição de 1:500 (Santa Cruz; Biotecnologia Ltd, Wembley, Middlesex, Reino Unido -c-20). As lâminas foram lavadas três vezes em PBS por três minutos. Incubou-se as lâminas em câmara úmida com anticorpo secundário biotinizado IgG-rabbit (ABC Elite, Vector) e após lavagem foi incubado com o complexo conjugado com peroxidase. Cada etapa teve duração de 30 minutos à 37°C, após cada incubação foram lavadas três vezes em PBS, por três minutos. As lâminas foram colocadas em solução de cromógeno (70 mg de DAB p/ 100 ml de tris-HCL) e na hora do uso foi acrescentado 30 microlitros de Água Oxigenada 30 V. Esperou-se a revelação por cinco minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Foram contra coradas com Hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por 5 minutos.

Montagem: As lâminas foram desidratadas em banho de álcool 70°, por um minuto, banho de álcool 95°, por um minuto e três banhos de álcool absoluto por um minuto cada banho. A diafanização foi realizada em três banhos de Xilol, por um minuto cada banho. Finalmente montadas com lamínula e resina sintética.

Análise das Imunomarcações: A densidade de área marcada positivamente para VEGF, VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 na membrana corioalantóide foi avaliada utilizando-se análise de imagem. Foram realizadas com auxílio do *software* Image J®, a partir de fotomicrografias obtidas dos cortes. Cinco fotos foram avaliadas de cada corte em cada um dos locais específicos (CG, CnG e Cut), para cada imunomarcador. As fotomicrografias foram obtidas com objetiva 40x, sendo analisados todos os campos de cada lâmina. Para controle negativo e positivo foram utilizadas amostras de endométrio de éguas em diestro e estro.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* estatístico SPSS 17. Médias, erros padrões (SE) ou desvios padrões (SD) foram calculados para cada grupo.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrão (média, erros padrão da média). Os dados originais foram primeiramente testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias.

Quando não obedeceram às premissas foram analisados por métodos não paramétricos. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorrem diferenças estatísticas entre os diferentes grupos para uma determinada variável resposta.

Comparações múltiplas one-way ANOVA seguidas pelo teste de Tukey ou Kuskal-Wallis, seguidas pelo pós-teste de Bonferroni foram aplicadas para comparação dos desfechos gestacionais e morfologia da membrana corioalantóide nos grupos estudados. Uma análise multivariada foi realizada para se avaliar os efeitos da paridade sobre os desfechos gestacionais e morfologia da membrana corioalantóide, bem como, entre estas variáveis e a análise imunohistoquímica.

7 RESULTADOS

O peso do potro foi influenciado positivamente pelo número de partos quando se avaliaram éguas primíparas versus éguas pluríparas, no entanto não foram obtidas diferenças significativas quando se compararam o peso de potros de éguas com 2 a 5 e 6 a 10 partos. O número de partos não influenciou o peso e volume totais da membrana corioalantóide (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise descritiva (Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão) das variáveis, peso do potro, peso da membrana corioalantóide e volume da membrana corioalantóide a termo, relacionada ao número de partos das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013

Variável	Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Peso potro (g)	Primíparas	18	5475,6 ^a	5824,3	1372,8	0,02
	2 a 5 partos	14	5930,1 ^b	4987,4	1332,9	
	6 a 10 partos	18	6022,2 ^b	7075,7	1667,8	
Peso da membrana corioalantóide (g)	Primíparas	18	6543,9 ^a	1234,0	290,8	
	2 a 5 partos	14	6508,6 ^a	1279,3	341,9	
	6 a 10 partos	18	6334,1 ^a	1139,2	276,3	
Volume da membrana corioalantóide (cm³)	Primíparas	18	6232,3 ^a	1175,2	277,0	
	2 a 5 partos	14	6198,6 ^a	1218,3	325,6	
	6 a 10 partos	18	6032,5 ^a	1085,0	263,1	

PSI: Puro Sangue Inglês.

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada variável ($p < 0,05$).

Foi observada diferença estatisticamente significativa na fração de volume representada CG sendo maior no grupo 2 a 5 ($p=0,04$) e no grupo 6 a 10 partos ($p=0,004$), quando comparada ao grupo primípara. Também foi observada diferença estatística na fração de volume relativo ao Cut sendo maior em primíparas ($p=0,047$) com relação ao grupo 2 a 5 partos (Figura 5). Quando realizada a conversão dos volumes relativos em volume absolutos às diferenças estatísticas deixam de ser significativas.

Figura 5 – Fração de volume das diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo (% de volume da membrana amniótica, % de volume da estrela cervical, % de volume do Corno não Gestante (CnG), % de volume do Corpo do útero (Cut) e % de volume do Corno Gestante (CG) em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

(GUIMARÃES, C. F., 2013).

Foi observada uma tendência ($p < 0,06$) a um maior volume total dos vilos nos grupo primíparas, quando comparados ao grupo 2 a 5 e 6 a 10 partos (Figura 6).

Figura 6 - Volume Total (VT) (cm^3) dos microcompartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) da membrana corioalantóide a termo no Corno Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Corno Gestante (CG), em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes indicam tendência a diferença estatística entre os grupos ($p < 0,06$)

(GUIMARÃES, C. F., 2013).

Houve diferença estatística entre a porcentagem dos microcompartimentos do CG. Sendo observada maior porcentagem de córion no grupo 2 a 5 partos quando comparado ao grupo 6 a 10 partos ($p=0,048$). Da mesma forma a maior porcentagem dos vilos no grupo 6 a 10 partos, quando comparado ao grupo de 2 a 5 partos ($p=0,01$) (Figura 7A).

Há uma tendência a um maior volume total de vilos no CG do grupo 6 a 10 partos quando comparado ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,052$). Assim como há tendência à diferença, aparentemente maior no volume total da mesoderme alantóide entre o grupo 2 a 5 partos e os demais ($p<0,06$) (Figura 7B).

Figura 7 - (A) Porcentagens médias dos microcompartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) relacionados ao Corno Gestante (CG), da membrana corioalantóide a termo. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$). (B) Volume total (cm^3) dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do CG da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam tendência a diferença estatística entre os grupos ($p<0,06$)

(Guimarães, C.F., 2013).

Não foi observada diferença estatísticas entre a porcentagem média (Figura 8A) e volume total dos microcompartimentos do CnG (Figura 8B) entres os grupos primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos.

Figura 8 - (A) Porcentagem média dos microcompartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do Corno não Gestante (CnG) da membrana corioalantóide a termo. (B) Gráfico de Barras representando o volume total (cm³) dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do CnG da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

(GUIMARÃES, C. F., 2013).

Em primíparas foi observado maior porcentagem de vilos quando comparadas ao grupo de 2 a 5 partos ($p=0,02$). Assim como a porcentagem da mesoderme alantóica na região do Cut foi menor em primíparas quando comparado ao grupo de 2 a 5 partos ($p=0,043$) (Figura 9A).

Houve diferença estatística no volume total entre os microcompartimentos com relação ao Cut, apresentando um maior volume total dos vilos no grupo primíparas quando comparado ao grupo de 2 a 5 partos ($p=0,008$), e comparado ao grupo de 6 a 10 partos ($p=0,027$). Também foi observada diferença estatística no volume total dos vasos do alantóide nessa região sendo menor no grupo de 2 a 5 partos quando comparado ao grupo de 6 a 10 partos ($p=0,049$) (Figura 9B).

Figura 9 - (A) Porcentagem de volume dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) relacionado ao Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a term. (B) Gráfico de Barras representando volume total (cm³) dos micros compartimentos (córion, vilos, mesoderme alantoideana e vasos do alantóide) do Cut da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

(GUIMARÃES, C. F., 2013).

A densidade total de superfície dos vilos na membrana corioalantóide foi maior no grupo primíparas comparado aos grupos 2 a 5 partos ($p=0,04$) e 6 a 10 partos ($p=0,025$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise descritiva (Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão) da densidade total de superfície dos vilos (um⁻¹) e a superfície total dos vilos (m²) da membrana corioalantóide a termo em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Densidade total de Superfície dos vilos (um ⁻¹)	Primípara	18	0,08 ^a	0,02	0,004	0,04
	2 a 5 partos	14	0,06 ^b	0,01	0,004	
	6 a 10 partos	18	0,06 ^b	0,01	0,003	
Superfície total dos vilos (m ²)	Primípara	18	34,71 ^a	9,97	2,350	
	2 a 5 partos	14	29,25 ^b	7,53	2,170	
	6 a 10 partos	18	30,85 ^b	7,81	1,890	

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Embora não observada diferença estatisticamente significativa, éguas com 2 a 5 partos tendem ($p < 0,06$) a apresentar microcotilédones mais altos (Figura 10A) e mais compridos na base (Figura 10B) nos CG e CnG comparadas aos demais grupos.

Figura 10 – (A) Altura média dos microcotilédones nas diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo Corno não Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Corno Gestante (CG) em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). (B) Gráfico de Barras representando o comprimento médio dos microcotilédones nas diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo CnG, Cut e CG em éguas Puro Sangue Inglês com diferentes paridades (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam tendência à diferença estatística entre os grupos ($p < 0,06$)

(GUIMARÃES, C.F., 2013).

O volume total dos vilos no CG foi maior no grupo 6 a 10 partos quando comparado ao grupo primíparas ($p=0,049$) e ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,02$). O volume total dos vilos no Cut foi maior no grupo primíparas quando comparado ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,008$) e grupo 6 a 10 partos ($p=0,02$) (Figura 11A).

O volume total de vasos nos vilos placentários na zona Cut foi maior em primíparas quando comparado ao grupo 6 a 10 partos ($p=0,01$) (Figura 11B). Da mesma forma o volume total do mesênquima ($p=0,02$; Figura 11C) e o volume total de trofoblasto ($p=0,02$ - Figura 11D) nos vilos placentários na zona Cut quando comparado ao grupo 6 a 10 partos.

Figura 11 - (A) Volumes totais dos vilos nas diferentes zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), e Corpo do útero (Cut), da membrana corioalantóide a termo. (B) Volumes totais dos vasos nos vilos placentários CG, CnG e Cut da membrana corioalantóide a termo. (C) Volumes totais do mesênquima nos vilos placentários nas zonas placentárias CG, CnG e Cut, da membrana corioalantóide a termo. (D) Volume totais do trofoblasto nos vilos placentários nas zonas placentárias CG, CnG, Cut, da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

(GUIMARÃES, C.F., 2013).

Houve tendência à diferença estatística quanto à densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento das zonas da membrana corioalantóide), entre os grupos 6 a 10 partos e 2 a 5 partos ($p=0,053$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise descritiva (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) da densidade microcotiledonária total (número de cotilédones por unidade de comprimento) das zonas placentárias Corno não Gestante (CnG), Corpo do útero (Cut) e Corno Gestante (CG) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sague Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo - 2013

Grupo	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Primípara	1,937234 ^{ab}	0,4790512	0,0698768	0,053
2 a 5 partos	1,689706 ^b	0,6655164	0,1141351	
6 a 10 partos	2,051930 ^a	0,8217869	0,1088483	

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,06$).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos primíparas, 6 a 10 partos e 2 a 5 partos no que diz respeito à densidade microcotiledonária na região do CG (tabela 4).

Tabela 4 - Análise descritiva da densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do Corno Gestante (CG) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sague Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo - 2013

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Primíparas	18	2,077333 ^a	0,3608020	0,0931587	
2 a 5 partos	14	1,856364 ^a	0,7757612	0,2339008	
6 a 10 partos	18	2,051667 ^a	0,7594057	0,1789936	

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Houve diferença estatística quanto à densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do CnG da membrana corioalantóide, entre os grupos 6 a 10 partos e 2 a 5 partos ($p=0,04$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise descritiva da densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do Corno não Gestante (CnG) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sague Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo - 2013

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Primípara	18	1,963125 ^{ab}	0,6476699	0,1619175	0,04
2 a 5 partos	14	1,410000 ^b	0,5449771	0,1573213	
6 a 10 partos	18	2,098421 ^a	0,8924203	0,2047353	

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Não foi observada diferenças estatística entre os grupos primíparas, 6 a 10 partos e 2 a 5 partos no que diz respeito à densidade microcotiledonária na região do Cut (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise descritiva da densidade microcotiledonária (número de cotilédones por unidade de comprimento) na região do Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013

Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Primíparas	18	1,780000 ^a	0,3407052	0,0851763	
2 a 5 partos	14	1,828182 ^a	0,6225563	0,1877078	
6 a 10 partos	18	2,008000 ^a	0,8460347	0,1891791	

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Foi observada diferença estatística quanto à eficiência placentária entre os grupos primíparas e os demais grupos. Assim o grupo primíparas demonstrou menor eficiência placentária quando comparados ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,01$). Bem como em relação ao grupo 6 a 10 partos ($p=0,03$) (Tabela 7).

Tabela 7. - Análise descritiva da Eficiência Placentária, (razão peso do potro por área de placenta (Kg/m²) da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês (primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) - São Paulo – 2013

Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p
Primíparas	18	1,6861 ^b	0,43701	0,10300	0,023
2 a 5 partos	14	2,1400 ^a	0,60902	0,17581	
6 a 10 partos	18	2,0171 ^a	0,34847	0,08452	

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos para as variáveis relativas aos fatores de crescimento angiogênicos Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corno Gestante (CG) (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) do Grupo (Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) para as variáveis Flk, VEGF e Flt-1 na região do Corno Gestante (CG) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Primíparas	Flk-1	9,3807 ^a	9,7543	3,4486
	VEGF	2,3766 ^b	1,3359	0,4723
	Flt-1	25,0156 ^c	10,8127	3,8228
2 a 5 partos	Flk-1	16,1035 ^a	16,8511	6,3687
	VEGF	3,2691 ^b	2,2111	0,8315
	Flt-1	23,9871 ^c	15,8896	6,0057
6 a 10 partos	Flk-1	18,8541 ^a	14,1137	6,3118
	VEGF	4,3678 ^b	2,5111	1,1235
	Flt-1	35,8692 ^c	17,0638	7,6312

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a refere-se ao imuno marcador Flk-1, b refere-se ao imuno marcador VEGF e c refere-se ao imuno marcador Flt-1, nos diferentes grupos avaliados.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corno não Gestante (CnG) (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) do Grupo (Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corno não Gestante (CnG) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês (PSI) - São Paulo – 2013

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Primíparas	Flk-1	8,0263 ^a	10,1461	3,5872
	VEGF	1,6386 ^b	0,7935	0,2805
	Flt-1	30,8857 ^c	13,4699	4,7623
2 a 5 partos	Flk-1	11,1739 ^a	13,3566	4,7623
	VEGF	2,1187 ^b	1,7131	0,6474
	Flt-1	17,7902 ^c	6,6499	2,5134
6 a 10 partos	Flk-1	16,4551 ^a	18,7145	9,3572
	VEGF	1,6251 ^b	0,2535	0,1133
	Flt-1	29,1754 ^c	12,8817	5,7609

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a refere-se ao imuno marcador Flk-1, b refere-se ao imuno marcador VEGF e c refere-se ao imuno marcador Flt-1, nos diferentes grupos avaliados.

Foi observada diferença estatística entre os grupos 2 a 5 partos e 6 a 10 partos, sendo maior a área de imunomarcagem positiva para o receptor Flk-1 ($p=0,0452$) no grupo 2 a 5 partos quando comparado ao grupo 6 a 10 partos, na região do Cut (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) do Grupo (Primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos) para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 na região do Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Primíparas	Flk-1	1,6737 ^{ab}	1,4859	0,5253
	VEGF	1,7061 ^c	1,1469	0,4055
	Flt-1	21,6978 ^d	6,3817	2,2562
2 a 5 partos	Flk-1	4,0983 ^a	4,8134	1,8193
	VEGF	7,1778 ^c	7,2246	2,7676
	Flt-1	23,1364 ^a	13,1977	4,9882
6 a 10 partos	Flk-1	0,5411 ^b	0,2309	0,1154
	VEGF	1,5512 ^c	0,3921	0,1753
	Flt-1	21,3974 ^d	10,3178	4,6142

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a e ab refere-se ao imuno marcador Flk-1, c refere-se ao imuno marcador VEGF e d refere-se ao imuno marcador Flt-1, nos diferentes grupos avaliados

Não foi observada diferença estatística significativa entre as zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo Primíparas (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) das regiões (zonas) placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo Primíparas - São Paulo – 2013

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
CG	Flk-1	9,3807 ^a	9,7543	3,4486
	VEGF	2,3766 ^b	1,3359	0,4723
	Flt-1	25,0156 ^c	10,8127	3,8228
CnG	Flk-1	8,0263 ^a	10,1461	3,5872
	VEGF	1,6386 ^b	0,7935	0,2805
	Flt-1	30,8857 ^c	13,4699	4,7623
Cut	Flk-1	1,6737 ^a	1,4859	0,5253
	VEGF	1,7061 ^b	1,1469	0,4055
	Flt-1	21,6978 ^c	6,3817	2,2562

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a refere-se ao imuno marcador Flk-1, b refere-se ao imuno marcador VEGF e c refere-se ao imuno marcador Flt-1, nos diferentes grupos avaliados.

Foi observada diferença estatística significativa entre as zonas placentárias para a área de imunomarcção positiva para Flk-1, sendo menor na região do Cut ($p=0,0077$) quando comparada a zona CnG no grupo 2 a 5 partos (Tabela 12).

Tabela 12 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) das regiões (zonas) placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo 2 a 5 partos - São Paulo – 2013

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
CG	Flk-1	16,1035 ^{ab}	16,850	6,3687
	VEGF	3,2691 ^c	2,2111	0,8315
	Flt-1	23,987 ^d	15,8896	6,0057
CnG	Flk-1	11,1739 ^a	13,3566	5,0483
	VEGF	2,1187 ^c	1,7131	0,6474
	Flt-1	17,7902 ^d	6,6499	2,5134
Cut	Flk-1	4,0983 ^b	4,8134	1,8193
	VEGF	7,1778 ^c	7,3224	2,7676
	Flt-1	23,1364 ^d	13,1977	4,9882

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a e ab refere-se ao imuno marcador Flk-1, c refere-se ao imuno marcador VEGF e d refere-se ao imuno marcador Flt-1, nos diferentes grupos avaliados.

Foi observada diferença estatística significativa entre as zonas placentárias para a área de imunomarcção positiva para VEGF, sendo maior na região do CG ($p=0,0487$) quando comparadas as demais zonas (Cut e CnG) no grupo 6 a 10 partos (Tabela 13).

Tabela 13 - Efeito (Média, Desvio Padrão e Erro Padrão) das regiões (zonas) placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut) da membrana corioalantóide a termo de éguas Puro Sangue Inglês, para as variáveis Flk-1, VEGF e Flt-1 no grupo 6 a 10 partos - São Paulo – 2013

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
CG	Flk-1	18,8541 ^a	14,1137	6,3118
	VEGF	4,3878 ^b	2,5111	1,1231
	Flt-1	35,8692 ^d	17,0638	7,6312
CnG	Flk-1	16,4551 ^a	0,2535	0,1133
	VEGF	1,6251 ^c	0,2535	0,1133
	Flt-1	29,1754 ^d	12,8817	5,7609
Cut	Flk-1	0,5411 ^a	0,2309	0,1154
	VEGF	1,5512 ^c	0,3921	0,1753
	Flt-1	21,3974 ^d	10,3178	4,6142

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a refere-se ao imuno marcador Flk-1, b e c refere-se ao imuno marcador VEGF e d refere-se ao imuno marcador Flt-1, nos diferentes grupos avaliados.

Convertendo em volume absoluto, por meio da correção das áreas marcadas dos vilos em cada região estudada, persistiu a diferença estatística na zona placentária CG, sendo maior a área de imunomarcção para o VEGF nesta região no grupo 6 a 10 partos ($p=0,018$) quando comparadas ao grupo primípara ($p=0,030$) e com o grupo 2 a 5 partos ($p=0,042$) (Figura 12). A área de imunomarcção positiva para o VEGF após a conversão, na região do Cut apresentou maior expressão no grupo 2 a 5 partos ($p=0,042$) quando comparado ao grupo 6 a 10 partos ($p=0,043$) (Figura 12; 13).

Figura 12 – Fração de área marcada para o imunomarcador VEGF convertida em volume absoluto para as diferentes zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), e Corpo do útero (Cut), da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês para os grupos primíparas; 2 a 5 partos e 6 a 10 partos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

(GUIMARÃES, C. F., 2013).

Figura 13 – Fotomicrografia da membrana corioalantóide a termo das éguas Puro Sangue Inglês, para a obtenção da área marcada para o imunomarcador VEGF. (A) Corno Gestante (CG) do grupo primíparas, (B) Corno não Gestante (CnG) do grupo primíparas, e (C) Corpo do útero (Cut) do grupo primíparas. (D) CG do grupo 2 a 5 partos, (E) CnG do grupo 2 a 5 partos, (F) Cut do grupo 2 a 5 partos. (G) CG do grupo 6 a 10 partos, (H) CnG do grupo 6 a 10 partos, (I) Cut do grupo 6 a 10 partos. (J) controle negativo da reação e (L) controle positivo (endométrio de égua em estro). Contra coloração HE. Aumento de 4x

(GUIMARÃES, C. F., 2013).

Para os demais imunomarcadores, após a conversão para o volume absoluto, por meio da multiplicação pelo volume total dos vilos em cada uma das regiões deixaram de existir diferenças estatísticas significativas para a área imunomarcada (Figura 14 A; B).

Figura 14 – Fração de área marcada para o imunomarcador Flt-1 (A) representando a fração de área marcada para o imunomarcador Flk-1 (B) convertidas em volume absoluto, para as diferentes zonas placentárias Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG), e Corpo do útero (Cut), da membrana corioalantóide a termo, quanto ao número de parto das éguas Puro Sangue Inglês para os grupos primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

(GUIMARÃES, C.F., 2013).

8 DISCUSSÃO

Com a finalidade de elucidar quais variáveis estariam relacionadas com o peso do potro ao nascimento, buscamos por meio do estudo estereológico, uma avaliação em três dimensões de volume das macro e microrregiões placentárias nos diferentes compartimentos, a fim de estabelecer relações não determinadas com a histologia convencional em duas dimensões.

Foi observado que quanto maior o número de partos maior é o peso do neonato. Assim potros de fêmeas primíparas apresentam menor peso quando comparados aos demais grupos, o maior peso foi observado em potros nascidos de mães entre 6 a 10 partos ($p=0,02$), seguido de 2 a 5 partos, com médias de 60.222,2 e 59.307,1 gramas respectivamente ($p>0,05$). Segundo trabalhos pioneiros de Hintz, Hintz e Van Vleck (1979) potros nascidos de éguas primíparas nascem menores, provavelmente pela inabilidade da mãe de produzir nutrientes suficientes para o feto, apresentando no geral, medidas placentárias também menores. No entanto, Wilsher e Allen (2003) acompanharam duas gestações sucessivas da mesma fêmea mensurando variáveis placentárias e não encontraram aumento evidente no peso e volume do alantocórion. No presente experimento, da mesma forma, não foi encontrado aumento do peso ou do volume das membranas, relacionado ao aumento do número de partos, considerando os grupos experimentais primíparas, 2 a 5 partos e 6 a 10 partos.

O menor espaço intrauterino disponível para o crescimento fetal na primeira gestação, devido à reduzida capacidade de distensão da parede uterina pode ser uma das razões para o menor peso ao nascimento da primeira cria. Rice (1998) considera que o mecanismo envolvido no remodelamento do útero para acomodação da placenta e crescimento fetal, em cada gestação, associado aos tecidos e aos fluidos podem representar um mecanismo estimulatório que contribui para o crescimento concomitante do útero. Da mesma forma que o feto pode ser responsável pela expansão uterina.

Encontramos no presente experimento, que a proporção de volume do CG foi maior nas éguas com maior número de partos, esse maior volume pode representar maior área para o desenvolvimento fetal, suportando maior crescimento, o que poderia justificar em parte um potro mais pesado em pluríparas.

Embora não estatisticamente significativo os demais compartimentos também aumentam em proporção com o aumento no número de partos. Exceto para o volume do Cut que foi maior nas éguas primíparas e diminuiu estatisticamente com o aumento no número de

partos, essa diminuição pode ter ocorrido pela expansão de todos os compartimentos uterinos, principalmente do CG, deixando em termos de proporção o Cut desprivilegiado. Contudo após a conversão em valores absolutos, corrigidos pelo volume de cada compartimento, as diferenças tanto para o CG em pluríparas como para o Cut em primíparas deixaram de existir.

A menor porcentagem de córion no grupo 6 a 10 partos contrapõem a maior porcentagem dos vilos, assim como o maior volume total dos vilos quando comparado ao grupo 2 a 5 partos na região do CG ($p=0,048$). O córion é o microcompartimento que da origem estruturalmente as macros e microvilosidades, assim uma menor porcentagem desse compartimento, pode ser relacionada a uma maior porcentagem dos vilos observada no grupo 6 a 10 partos nesta região. Wilsher e Allen (2003) não encontraram diferenças estatísticas entre a porcentagem do córion e o aumento da idade materna ($p=0,79$), porém com a conversão em volume absoluto relatam marcado aumento do volume do córion em éguas mais velhas. Dado contrário ao observado em nosso estudo.

O volume total dos vilos no Cut foi maior no grupo primíparas quando comparado ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,008$) e ao grupo 6 a 10 partos ($p=0,027$). Podendo ser justificado pela maior proporção do macrocompartimento Cut nas éguas primíparas.

No grupo 2 a 5 partos os microcotilédones tenderam a ser mais altos e mais compridos na base do córion, tanto nas zonas CG e CnG, podendo assim estabelecer uma maior superfície de contato materno fetal para trocas. Justificando os maiores pesos dos potros nascidos do grupo 2 a 5 partos quando comparado ao grupo primíparas, sem diferenças no peso e volume das membranas corioalantóide. Esses achados podem funcionar como um mecanismo complementar na melhoria de transporte nutricional.

Bracher, Mathias e Allen (1996) afirmam que a maior idade, assim como a pluriparidade, das fêmeas equinas interfere no desenvolvimento dos microcotilédones reduzindo-os, tanto no tamanho das macrovilosidades, como das microvilosidades. Corroborando com a tendência observada no presente experimento, em que as membranas corioalantóide das fêmeas com 6 a 10 partos tenderam a apresentar microcotilédones mais baixos e com menor comprimento de base quando comparado ao grupo 2 a 5 partos ($p<0,06$).

Os vasos do alantóide na zona do Cut foram menores no grupo 2 a 5 partos e maiores no grupo com maior número de partos ($p=0,049$). Com o aumento da pluriparidade ocorrem mudanças degenerativas fibróticas das glândulas endometriais, diminuindo a nutrição histotrófica para o conceito, o que pode contribuir para o menor desenvolvimento dos microcotilédones (WILSHER; ALLEN, 2000), assim o aumento no número de vasos do alantóide encontrado no presente trabalho pode ter efeito compensatório para nutrição.

O volume total dos vasos ($p=0,01$), do mesênquima ($p=0,02$) e do trofoblasto ($p=0,02$) nos vilos placentários na zona Cut foram maiores em primíparas quando comparado ao grupo 6 a 10 partos. Foi observado também que a composição volumétrica dos componentes dos vilos foi maior em éguas primíparas. Contudo, apesar de possuir a maior composição estrutural para trocas materno fetais, justificada também por uma maior densidade total de superfície dos vilos ($p=0,04$), o grupo primíparas apresenta menor eficiência placentária ($p=0,01$) quando comparado aos demais grupos.

Não foi observado aumento na densidade de superfície dos vilos com o aumento da paridade. Resultado que pode ser explicado por um aumento da eficiência placentária com o decorrer das gestações, sendo produzido em média 2,140 Quilogramas (Kg) de potro por metro quadrado (m^2) de placenta no grupo 2 a 5 partos em comparação a 1,6861 Kg/ m^2 no grupo primíparas. Esses dados corroboram com os achados da literatura descritos por Wilsher e Allen (2003) que observaram correlação negativa entre densidade de superfície dos vilos e a eficiência placentária. Contudo existem vários mecanismos para avaliação de eficiência placentária como volume total de vasos e receptores.

No que diz respeito à densidade microcotiledonária (número de microcotilédones por unidade de comprimento) no CnG, encontramos uma maior densidade microcotiledonária no grupo 6 a 10 partos quando comparado ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,04$), cerca de 2,1 microcotilédones por unidade de comprimento comparado a 1,41 respectivamente, podemos determinar que a menor densidade microcotiledonária no grupo 2 a 5, pode estar relacionada a sua maior eficiência placentária. Determinando um efeito compensatório, somados as tendências de maiores altura e comprimentos das bases dos vilos no grupo 2 a 5 partos, principalmente no CG, o que pode sugerir uma maior área de troca placentária, resultando em um maior peso de potro ao nascimento no grupo 2 a 5 quando comparado ao grupo primíparas.

Allen et al. (2002a) determinaram em experimentos com Transferência de Embriões (TE) entre embriões de raças de maior porte para menor porte, que a densidade dos microcotilédones é controlada pela mãe. Os autores encontraram maior densidade dos microcotilédones em placentas das éguas de maior porte quando comparadas as éguas de menor porte. Em 2003, Wilsher e Allen encontraram a redução da densidade microcotiledonária causada pela primiparidade ou pela degeneração endometrial relacionada à idade, contudo os microcotilédones não aumentaram em comprimento. Vale ressaltar que a densidade microcotiledonária não acompanhada da densidade total de superfície dos vilos, não representa muito, pois só é considerado o número de microcotilédones por unidade de

comprimento, não levando em consideração a real ramificação dos microcotilédones (densidade de área), assim recomenda-se uma maior atenção às avaliações de densidade total de superfície dos vilos.

Em mamíferos, o maior determinante do crescimento intrauterino é o suprimento de nutrientes placentários para o feto. A capacidade de transferência de nutrientes depende do tamanho, morfologia, fluxo sanguíneo e a eficiência do transporte (FOWDEN et al., 2006). O que determina o número de quilogramas de feto suportado por metro quadrado de contato materno fetal, até o nascimento (LEISER; KAUFMANN, 1994). A média da eficiência placentária para os grupos foi menor nas fêmeas primíparas ($p=0,023$). Em geral, a eficiência placentária aumenta com a paridade durante a vida reprodutiva das fêmeas, atinge um platô na meia idade, mas declina com o avanço da idade materna, ou em sucessivas gestações conforme defendido por Dwyer et al. (2005) e Bravo, Garnica e Puma (2009) corroborando com os achados deste estudo.

Allen e Wilsher (2007) postularam que fatores angiogênicos como VEGF e seus receptores Flk-1 e Flt-1 podem facilitar o desenvolvimento da rede vascular materna e fetal para as trocas dos produtos necessários durante o decorrer da gestação. Esses receptores apresentam expressão quase restrita às células endoteliais (TERMAN et al., 1992; CHARNOCK-JONES; KAUFMANN; MAYHEW, 2004). Corroborando com o observado, em nosso estudo, a expressão foi quase restrita as células endoteliais dos vilos dos microcotilédones nos três grupos e para as três proteínas avaliadas.

Segundo Vuckovic et al. (1996), a expressão do Flk-1 é mais intensa durante o início da gestação, no estabelecimento das ramificações dos capilares e declinam após o primeiro trimestre enquanto o Flt-1 aumentam sua expressão com o avanço da gestação, do segundo ao último trimestre (CLARK et al., 1996). No presente estudo avaliamos a membrana corioalantóide a termo das éguas nas diferentes regiões, e não observamos diferenças na expressão desse receptor, em nenhum dos grupos e em nenhuma das regiões avaliadas.

Foi observada diferença estatística significativa na imunomarcagem positiva para VEGF na membrana corioalantóide a termo entre as zonas placentárias, sendo maior na região do CG quando comparadas as demais zonas (Cut e CnG) para o grupo 6 a 10 partos quando comparadas ao grupo primípara ($p=0,030$) e grupo 2 a 5 partos ($p=0,042$), persistindo esta diferença mesmo após a conversão para valores absolutos ($p=0,018$).

O aumento da intensificação da expressão do VEGF no terço final da gestação pode refletir condições de hipóxia em ambos os tecidos maternos e fetais, devido ao aumento da demanda de oxigênio pelo rápido crescimento do feto enquanto o crescimento utero

placentário é desacelerado (REYNOLDS et al., 2010). Pashen e Allen (1979a) sugeriram que as altas concentrações de estrógenos secretadas pelo trofoblasto no final da gestação pode também atuar como papel de regulação positiva para o VEGF. O aumento na expressão do VEGF em éguas mais velhas pode ocorrer devido a uma menor área de endométrio disponível para o estabelecimento da placentação, resultante da endometrose senil. Este mecanismo pode estar relacionado ao aumento da resistência vascular, por deposição de tecido fibrótico e consequente diminuição do calibre dos capilares endometriais. Tal efeito compensatório pode ocorrer por um aumento na expressão do VEGF induzido pelo processo de hipóxia, e geração de um provável aumento do fluxo sanguíneo local, como conjecturado por Stolla e Bollwein (1997) apud Wilsher e Allen, (2003), a fim de prover a nutrição adequada ao feto.

A porcentagem dos vilos na região do CG também foi maior no grupo 6 a 10 partos quando comparado aos demais grupos, as diferenças persistiram mesmo após a conversão para volume absoluto, reforçando que a disponibilidade de mais superfície dos vilos, pautada no maior volume total, fornece maior substrato para imunomarcção do VEGF nesse compartimento e neste grupo.

A área de imunomarcção positiva para o VEGF na região do Cut foi menor no grupo 6 a 10 partos quando comparado ao grupo 2 a 5 partos ($p=0,043$). Essa diferença não havia sido notada antes da conversão em valores absolutos. Tal diferença pode ocorrer porque a zona Cut sofreu uma redução com o avanço da pluriparidade. Essa menor área de imunomarcção pode estar relacionada ao menor volume total dos vilos, como também menor volume total dos vasos nos vilos nesta região no grupo de maior pluriparidade, assegurando menor área para imunomarcção.

Assim, nossos achados indicam que na raça Puro Sangue Inglês a pluriparidade influencia positivamente o peso ao nascimento dos potros. A avaliação morfofuncional da placenta evidenciou que o aumento da paridade é determinante para ganho de eficiência placentária. A menor densidade de superfície dos vilos em animais dos grupos pluríparas, assim como o aumento do volume do CG, culminam no aumento da eficiência placentária que explicaria a produção de potros de maior peso nos grupos com maior número de partos. Além disso, as membranas corioalantóides das éguas pluríparas tendem a apresentar maior volume total do compartimento gestante, aumento na porcentagem de vilos, volume total de vilos, além de maior densidade microcotiledonária e expressão do VEGF na região do CG.

O grupo primípara apesar de possuir a maior composição estrutural para trocas no Cut e maior densidade de superfície dos vilos, não gera potros de maior peso, tampouco aumenta a expressão de fatores angiogênicos, culminando em uma menor eficiência placentária. Assim,

podemos estabelecer a provável relação que uma menor densidade de superfície determina uma maior eficiência placentária.

Diante do exposto, podemos observar que a placenta equina dispõe de vários mecanismos regulatórios e adaptativos, ainda não compreendidos, para promover uma melhor eficiência e geração de potros saudáveis, tais mecanismos devem ser mais bem estudados, afim do maior entendimento do funcionamento da interação materno fetal na espécie. A avaliação dos fatores de crescimento assim como o estudo estereológico completo nas diferentes zonas da membrana corioalantóide a termo das éguas PSI ainda não havia sido descrito na literatura, ressaltando as contribuições inéditas deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 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. Development in utero. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 445-453, Mar. 2002.
- ALLEN, W. R.; WILSHER, S. Immunohistochemical Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrus cycle and pregnancy. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 516-526, Oct. 2007.
- BARKER, D. J. Intrauterine programming of adult disease. **Molecular Medicine Today**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 418-423, Dec. 1995.
- BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 142, n. 3, p. 259-276, Aug. 1986.
- BRACHER, V.; MATHIAS, S.; ALLEN, W. R. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 23, n. 3, p. 180-188, May. 1996.
- BRAVO, P. W.; GARNICA, J.; PUMA, G. Cria alpaca body weight and perinatal survival in relation to age of the dam. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n. 2-4, p. 214-219, Apr. 2009.
- CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. Molecular Regulation. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, p. 103-113, Feb.-Mar. 2004.
- CLARK, D. E.; SMITH, S. K.; SHARKEY, A. M.; CHARNOK JONES, D. S. Localization of VEGF and expression of its receptors flt-1 and KDR in human placenta throughout pregnancy. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 1090-1098, May. 1996.
- COAN, P. M.; ANGIOLINI, E.; SANDOVICI, I.; BURTON, G. J.; CONSTANCIA, M.; FOWDEN, A. L.; Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 586, n. 18, p. 4567-4576, July. 2008.
- DWYER, C. M.; CALCERT, S. K.; FARISH, M.; DONBAVAND, J.; PICKUP, H. Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the

neonatal behavior of the lamb. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 4, p. 1092-1110, Mar. 2005.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. L.; WHITE, K. L.; TAYLOR, P. M. Equine uteroplacental metabolism at mid- and late gestation. **Experimental Physiology**, New York, v. 85, n. 5, May. 2000.

FOWDEN, A. L.; WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FORHEAD, A. J.; CONSTANCIA, M. Programming placental nutrient transfer capacity. **Journal of Physiology**, Cambridge, n. 1, v. 572, p. 5–15, Apr. 2006.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J.; COAN, P. M.; BURTON, G. J. The placenta and intrauterine programming. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 439–450, Feb. 2008.

FOWDEN, A. L.; SFERRUZZI-PERRI, A. N.; COAN, P. M.; CONSTANCIA, M.; BURTON, G. J. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 14, p. 3459-3472, July. 2009.

HINTZ, H. F.; HINTZ, R. L.; VAN VLECK, L. D. Growth rate of Thoroughbreds. Effect of age of dam, year and month of birth, and sex of foal. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 48, p. 480-487, Jan. 1979.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**: three-dimensional measurement in microscopy. 2. ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific, 2005, p. 278.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, Baltimore, v. 109, n. 3, p. 122-134, 1994.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER. HAVEMEYER FOUNDATION, 5., 2000, Saari, Finland. **Proceedings...** Saari, Finland, 2000. p. 74-75.

LUDWING, S.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; VON REISWITZ, A.; SCHOON, H. A. Angiopathies in the equine endometrial biopsy – a marker for extrauterine vascular lesions? Trabalho apresentado em: Equine Reproductive Medicine International Conference; 3., 2001, Hippiatrika, Equine reproductive medicine, **Pferdeheilkunder**, 2001, v. 17, n. 6, p. 608-614.

MAYHEW, T. M.; OHADIKE, C.; BAKER, P. N.; CROCKER, I. P.; MITCHELL, C. ONG,

S. S. Sterological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. **Placenta**, London, v. 24, n. 2-3, p. 219-226, Feb. 2003.

MAYHEW, T. M.; JENKINS, H.; TODD, B.; CLIFTON, V. L. Maternal asthma and placental morphology: effects of severity, treatment and fetal sex. **Placenta**, London, v. 29, n. 4, p. 366-373, Apr. 2008.

PASHEN, R. L.; ALLEN, W. R. Endocrine changes after foetal gonadectomy and during normal and induced parturition in the mare. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 2, n. 1-3, p. 271-288, June. 1979.

REIMER, J. M. Use of transcutaneous ultrasonography in complicated latter-middle to late gestation pregnancies in the mare: 122 cases. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997. **Proceedings...** 1997. n. 43, p. 259-261.

REYNOLDS, L. P.; CATON, J. S.; REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKS, A. T.; VONNAHME, K. A.; BOROWICZ, P. P.; LUTHER, J. C.; WALLACE, J. M.; WU, G.; SPENCER, T. E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **Journal of Physiology**, Cambridge, v. 572, n. 1, p. 51-58, Apr. 2006.

REYNOLDS, L. P.; BOROWICZ, P. P.; CATON, J. S.; VONNAHME, K. A.; LUTHER, J. S.; BUCHANAN, D. S.; HAFEZ, S. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Utero-placental vascular development and placental function: an update. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 54, n. 2-3, p. 355-365, Nov. 2010.

RICE, G. Mechano-transcription pathways involved in determining placental size. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 30, n. 6, p. 457, 1998. Abstract.

SIBLEY, C. P.; TURNER, M. A.; CETIN, I.; AYUK, P.; BOYD, C. A. R.; D'SOUZA, S. W.; GLAZIER, T. C.; GREENWOOD, S. L.; JANSON, T.; POWELL, T. L. Placental phenotypes of intrauterine growth. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 58, n. 5, p. 827-832, July. 2005.

SILVA, L. A.; KLEIN, C.; EARLY, A. D.; SHARP, C. D. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: a anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factors receptor system immunolocalization and gene expression study. **Reproduction**, v. 142, n. 4, p. 593-603, 2011.

BLAICH, U.; PETZOLDL, S.; BAFTMANN, C. P.; LORBERL, K.; SCHOON, H. A.; GERITRAILA, G.; BOLLWEIN, H. Doppler ultrasonographic studies of the uterine blood

flow in mares. **Pferdeheilkunde**, Germany, v. 5, n. 6, p. 547-550, 1999.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITRIOV, D.; GOSPODAROWICZ, D. C.; BOHLEN, P. Identification of KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 187, n. 3, p. 1579–1586, Sept. 1992.

VERAS, M. M.; DAMACEN-RODRIGUES, N. R.; CALDINI, E. G.; RIBEIRO, A. A. C. M.; MAYHEW, T. M.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHONIKOF, F. Particulate urban air affects the functional morphology of the mouse placenta. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 79, n. 3, p. 578-584, Sept. 2008.

VUCKOVIC, M.; PONTING, J.; TERMAZ, B. I.; NIKETIC, V.; SEIF, M. W.; KUMAR, S. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. **Journal of Anatomy**, London, v. 188, n. 2, p. 361–366, Apr. 1996.

WESTER, N. **Associations between placental parameters, mare and foal body condition score at birth, and foal health in the first month of life**. 2009. 49 f. (Tese de Doutorado). Universiteit Utrecht. Disponível em: <<http://igitur-archive.library.uu.nl/student-theses/2010-0211-200256/UUindex.html>>. Nov. 2009. Acesso em: july, 2011.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER. HAVEMEYER FOUNDATION, 5., 2000, Saari, Finland. **Proceedings...** Saari, Finland, 2000. p. 74-75.

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

WILSON, M. E.; FORD, S. P. Comparative aspects of placental efficiency. **Reproduction**, New York, v. 58, p. 223-232, June. 2001. Supplement.

RESUMO

GUIMARÃES, C. F. **Quais variáveis maternas, placentárias e paternas influenciam na biometria e vitalidade de neonatos equinos da raça Puro Sangue Inglês?** [Maternal, placental and paternal variables influence in biometrics and vitality of the Thoroughbred neonates?]. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Este trabalho objetivou correlacionar as variáveis maternas, paternas e placentárias, esta última por meio de estudo estereológico, com as variáveis neonatais, de potros da raça Puro Sangue. O delineamento experimental consistiu em um estudo analítico, observacional, transversal, prospectivo. Foram acompanhados cinquenta partos. Como critério de inclusão foram selecionadas apenas as fêmeas que apresentaram eutocia. As fêmeas foram divididas de acordo com a pluriparidade em três grupos, primíparas (n=18), 2 a 5 partos (n=14) e 6 a 10 partos (n=18). Foram correlacionadas variáveis maternas (número de partos, altura, perímetro torácico (PT)), variáveis paternas (idade, altura, PT), variáveis placentárias por meio do estudo estereológico (composição volumétrica dos diferentes compartimentos da placenta juntamente com as áreas de superfície de contato materno-fetal) e variáveis neonatais (peso, altura e escore de vitalidade neonatal). Entre as muitas correlações determinadas no grupo primíparas destacam-se peso da membrana corioalantóide com variáveis neonatais como peso ($r=0,598$), PT ($r=0,775$), tempo para mamar ($r=0,553$) e tempo de gestação ($r=-0,527$), além do PT da mãe com o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=0,564$), reflexo de sucção ($r=0,625$), para levantar ($r=0,756$) e decúbito esternal ($r=-0,590$). Da mesma forma no grupo 2 a 5 partos, neonatos que nasceram com maior peso, altura, e PT apresentaram menor tempo para levantar ($r=-0,546$; $r=-0,869$, $r=-0,892$), eliminação do mecônio ($r=-0,535$) e ruptura do cordão umbilical ($r=-0,528$; $r=-0,881$). Assim como no grupo 6 a 10 partos, o peso do potro apresentou correlação com o peso ($r=0,793$), PT ($r=0,716$) e altura ($r=0,667$) materna. O volume total do CG correlacionou com volume total do parênquima ($r=-0,816$) e epitélio nos vilos placentários do CG ($r=-0,915$), tempo de gestação ($r=-0,483$), tempo para reflexo de sucção ($r=-0,672$), para mamar ($r=-0,525$), e para eliminação do mecônio ($r=-0,525$). No que diz respeito às variáveis paternas, o peso paterno correlacionou com o volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG ($r=0,393$), além do PT do garanhão com o peso ($r=0,316$) e PT ($r=0,425$) do potro e volume total do CG ($r=0,319$). Desta forma, acredita-se que estes resultados possam fornecer ferramentas práticas para auxiliar na escolha das fêmeas e machos mais indicados para geração de potros neonatos com desenvolvimento adequado.

Palavras-chave: Membrana corioalantóide. Estereologia placentária. Primíparas. Pluríparas. Parto.

ABSTRACT

GUIMARÃES, C. F. Maternal, placental and paternal variables influence in biometrics and vitality of the Thoroughbred neonates? [Quais variáveis maternas, placentárias e paternas influenciam na biometria e vitalidade de neonatos equinos da raça Puro Sangue Inglês?]. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to evaluate the influence of parity on placental efficiency. To assess macro and microscopic area morphometry, and expression of VEGF and its receptors (VEGFR-1/Flt-1 and VEGFR-2/FLK) on allantochorion. Data regarding the interrelationship of parity, fetomaternal contact and birth weight in foal Thoroughbred were evaluated. The experimental study consisted of an analytical, observational, cross-sectional, prospective study. Placentas at term were collected after spontaneous expulsion during the third stage labour from fifty Thoroughbred mares. Only mares with normal deliveries were included. Mares were divided according to parity into three groups nulliparous (n = 18) multiparous 2 to 5 deliveries (n = 14) and multiparous 6 to 10 deliveries (n = 18). Among the numerous correlations determined in nulliparous mares, the most striking were membrane weight with neonatal variables such as weight ($r = 0.598$), thoracic perimeter (TP) ($r=0.775$), time to nurse ($r=0.553$) and gestational length ($r=-0.527$), and the maternal thoracic perimeter with time to rupture the umbilical cord ($r=0.564$), to have suckle reflex ($r = 0.625$), to stand ($r=0.756$) and achieve lateral recumbency ($r=-0.590$). Similarly in group 2-5 births, neonates born with greater weight, height and TP took less time to stand ($r=-0.546$; $r= -0.869$; $r =-0.892$), meconium ($r= -0.535$) and rupture the umbilical cord ($r=-0.528$; $r= -0.881$). As in group 6-10 deliveries, the weight of the foal correlated with maternal weight ($r=0.793$), TP ($r=0.716$) and height ($r=0.667$). The total volume of the PH correlated with total parenchyma ($r = -0.816$) and placental villous epithelium in PH ($r =-0.915$), gestational length ($r = -0.483$), time to have suckle reflex ($r = -0.672$), to nurse ($r=-0.525$) and pass meconium ($r = -0.525$). With regard to the paternal variables, stallion's weight correlated with total parenchyma in the placental villi of the CtH ($r=0.393$), and the paternal TP with the foal's weight ($r=0.316$) and ($r=0.425$) and total volume of the PH ($r = 0.319$). Correlations as discussed in this paper can provide practical tools to assist in choosing the most suitable stallions and mares to generate foals with possible superior athletic qualities.

Key-Words: Chorioallantoic membrane. Stereology. Placenta. Primiparous. Multiparous. Delivery.

QUAIS VARIÁVEIS MATERNAS, PLACENTÁRIAS E PATERNAS INFLUENCIAM NA BIOMETRIA E VITALIDADE DE NEONATOS EQUINOS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS?

9 INTRODUÇÃO

A procura de animais com melhor desenvolvimento e desempenho atlético é o foco de muitos criadores, e com base nessas necessidades, pesquisas científicas procuram relacionar a influência de determinadas variáveis no desenvolvimento futuro desses animais, de forma a projetar qual será o possível desempenho do potro neonato em sua vida adulta (RODRIGUES, 2006).

Características dos potros ao nascimento são consideradas indicativos importantes para o desenvolvimento e desempenho em sua vida adulta, principalmente no que diz respeito a deficiências nutricionais e número de partos das éguas (WILSHER; ALLEN, 2000).

Allen et al. (2002) e Veronesi et al. (2010) observaram correlação entre características placentárias e neonatais. Yamamoto, Asai e Kusunose (1993) afirmam que o peso e altura ao nascimento representam fatores importante para o desenvolvimento do animal. Wilsher e Allen (2000), também encontraram correlação positiva entre peso materno e peso do potro ao nascimento e entre peso ao nascimento e peso e área total do corioalantóide. O peso ao nascer e a interface de contato materno fetal demonstram que o crescimento do potro *in utero* é governado pelo tamanho real e competência da placentária.

Marteniuk et al. (1998) e Satué et al. (2011), relataram que o tempo gestacional foi influenciado por características paternas. Por outro lado, Davis-Morel et al. (2002) demonstraram não haver correlação significativa entre idade paterna e tempo de gestação, embora sejam conhecidos os problemas espermáticos atribuídos a idade.

No entanto, a abordagem diferenciada das variáveis placentárias, por meio de avaliação estereológica pode estabelecer correlações entre as estruturas microscópicas, componentes da membrana corioalantóide, com variáveis biométricas e de vitalidade neonatal, conjuntamente avaliadas com variáveis maternas e paternas, resultados ainda não exploradas na literatura.

Assim, o estudo de variáveis maternas, paternas, placentárias e neonatais, pode contribuir na obtenção de correlações pertinentes ao desempenho futuro dos potros. Desta

forma, objetivou-se neste trabalho correlacionar as variáveis maternas, paternas e placentárias, esta última por meio do estudo estereológicos, na busca de relações práticas com as variáveis biométricas e de vitalidade do neonato equino.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 POPULAÇÃO ANALISADA

O delineamento do estudo consistiu em um estudo analítico, observacional, transversal, prospectivo. Foram acompanhados cinquenta partos de éguas da raça Puro Sangue Inglês, nos meses de julho a dezembro de 2012, em um haras localizado na região de Bagé, no estado do Rio Grande do Sul (latitude $-31^{\circ}19'5''$, longitude $-54^{\circ}06'25''$). Todos os animais apresentaram gestação e parto sem qualquer intercorrência. As fêmeas foram divididas de acordo com a pluriparidade em três grupos, primíparas (n=18), 2 a 5 partos (n=14) e 6 a 10 partos (n=18).

10.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Variáveis maternas: o número de partos foi obtido das fichas zootécnicas de cada animal, altura, perímetro torácico (PT) e peso da égua foram obtidos por meio de fita métrica e balança convencional, na data prevista para o parto.

Variáveis paternas: a idade foi obtida das fichas zootécnicas de cada animal, altura, PT e peso dos machos foram obtidos por meio de fita métrica e balança convencional.

Variáveis placentárias: as membranas corioalantóides foram recolhidas imediatamente após o delivramento para a avaliação do peso total em balança convencional. As membranas foram pesadas e dispostas sobre uma superfície plana, convencionalmente formando a letra "F" e fotografadas com escala para posteriores aferições de sua área de superfície conforme adaptação do método de Allen et al. (2002). Foram coletados, em duplicata, fragmentos de três cm^2 do corioalantóide, correspondente as regiões do Corno Gestante (CG), Corno não Gestante (CnG) e Corpo do útero (Cut), fixadas por imersão em formol a 10% à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente foram mantidos em álcool 70% até as avaliações histológicas/esterológicas. As membranas corioalantóides foram amostradas utilizando-se um método randômico sistemático e uniforme em multi-estágios [systematic uniform random (SUR) design] (MAYHEW, 2006; MAYHEW et al., 2008).

Variáveis neonatais: Logo após o nascimento foram realizadas as aferições de altura e do peso por meio de balança convencional e do PT por meio da fita métrica. Também foi realizada uma avaliação de vitalidade neonatal incluindo os tempos para ruptura do cordão umbilical, para decúbito esternal, para reflexo de sucção, para levantar, para mamar e para liberação de mecônio.

10.3 AVALIAÇÃO ESTEROLÓGICA

Os fragmentos de tecido de cada região placentária foram incluídos de forma que cortes perpendiculares (cortes verticais) a superfície coriônica (plano horizontal) fossem obtidos. Este protocolo de amostragem tem a vantagem de randomizar o local de secção e orientação, sendo ambos necessários para se estimar as áreas de superfície juntamente com o volume dos tecidos (HOWARD; REED, 2005; MAYHEW, 2006).

Posteriormente os blocos foram cortados com auxílio de um micrótomo rotativo duas séries de cinco cortes de cinco μm de espessura selecionados randomicamente foram coletados em lâminas comuns e corados segundo método padrão de Hematoxilina Eosina (HE) e Picro-Sirus-Red (PSH). A análise estereológica foi realizada ao microscópio óptico. O objetivo foi estimar a composição volumétrica dos diferentes compartimentos da membrana juntamente com as áreas de superfície de contato materno-fetal.

Foram avaliados: Volume total da membrana e volume das zonas placentárias. Composição volumétrica dos compartimentos teciduais da membrana corioalantóide nas diferentes regiões placentárias. Composição tecidual dos microvilos da membrana corioalantóide nas diferentes regiões placentárias.

Neste estudo, o método estereológico utilizado foi adaptadas do método descrito por Allen et al. (2002) e Veras et al. (2008), descrições completa das técnicas podem ser encontradas em Guimaraes et al. (dados ainda não publicados).

10.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* estatístico SPSS 17. Médias, erros padrões (SE) ou desvios padrões (SD) foram calculados para cada grupo. Foram primeiramente testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média, erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecerem às premissas dos dados, quando não obedeceram às premissas foram através da análise não paramétrica. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorrem diferenças estatísticas entre os diferentes grupos para uma determinada variável resposta.

As correlações de Pearson e Spearman (PROC CORR) foram utilizadas para calcular a relação entre as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, assim os resultados foram expressos pelo coeficiente de correlação linear (r). Os coeficientes de correlação significativos ($p > 0,05$) com valores entre 0,1 a 0,49; 0,5 a 0,75 e 0,76 a 1 correspondem a correlações fraca, moderada e forte respectivamente. Testes de correlação foram realizados para avaliar o grau da correlação (e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa) entre as variáveis de biométricas do garanhão, da égua e do potro, bem como entre estas variáveis e as características morfológicas da membrana corioalantóide.

11 RESULTADOS

11.1 GRUPO ÉGUAS PRIMÍPARAS

No grupo de fêmeas primíparas o peso da membrana corioalantóide correlacionou-se negativamente com seu próprio volume ($r=-0,818$), positivamente com os volumes totais do córion ($r=0,774$), dos vilos ($r=0,649$) ainda quanto ao parênquima ($r=0,592$), epitélio ($r=0,725$) e vasos ($r=0,579$) nos vilos placentários (tabela 14).

O peso da membrana apresentou correlação com variáveis neonatais como peso ($r=0,598$), PT ($r=0,775$) e tempo para mamar ($r=0,553$), ainda correlação negativa com o tempo de gestação ($r=-0,527$). O PT do potro apresentou correlação com os volumes totais da membrana corioalantóide ($r=0,704$), mesoderme alantóide do CG ($r=0,544$), além do parênquima ($r=0,592$) e epitélio ($r=0,554$) dos vasos nos vilos placentários (Tabela 14).

Da mesma forma que o peso do potro foi influenciado pelo volume total do epitélio dos vasos nos vilos placentários ($r=0,532$) e volume total do córion no CnG, o volume total dos vilos correlacionou-se com os volumes totais dos vasos ($r=0,949$), parênquima ($r=0,946$) e epitélio ($r=0,944$) nos vilos placentários (Tabela 14).

O volume total do CG correlacionou inversamente com o tempo de gestação ($r=-0,577$) e diretamente como peso do potro ($r=0,704$) (Tabela 14).

Altura da mãe correlacionou positivamente com os volumes totais dos vasos no CnG ($r=0,564$), vasos ($r=0,644$), e parênquima ($r=0,566$) nos vilos placentários (Tabela 14).

Tabela 14 - Correlação entre variáveis placentárias (Peso e Volume total da membrana corioalantóide, Volume total do Corno Gestante (CG), Volume total do vilos e Mesoderme alantóide no CG, Volume total do córion no Corno não Gestante (CnG), Volume total dos vasos no CnG, Volume total do parênquima dos vilos placentários, Volume total do epitélio dos vilos placentários, Volume total dos vilos placentários) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo primíparas das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

(conclusão)				
Variável	Variável	N	r	P
Peso da membrana corioalantóide (g)	Volume da membrana corioalantóide (cm ³)	18	-0,818	<0,001
	Volume total do córion (cm ³)	18	0,774	<0,001
	Volume total dos vilos (cm ³)	18	0,649	<0,001
	Volume total do parênquima (cm ³)	14	0,592	0,026
	Volume total do epitélio nos vilos placentários (cm ³)	14	0,725	0,003
	Volume total dos vasos nos vilos placentários (cm ³)	14	0,579	0,030
	Tempo de gestação (dias)	18	-0,527	0,025
	Peso do potro (g)	18	0,598	0,009
	PT do potro (cm)	12	0,775	0,003
Volume total da membrana corioalantóide (cm ³)	Tempo para mamar (min)	17	0,553	0,019
	PT do potro (cm)	12	0,704	0,001
Volume total do CG (cm ³)	Tempo de gestação (dias)	18	-0,577	0,049
Volume total da mesoderme alantóide do CG (cm ³)	Peso do potro (g)	18	0,704	0,001
	PT do potro (cm)	12	0,544	0,049
Volume total dos vilos no CG (cm ³)	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	18	0,519	0,027
Volume total do córion no CnG (cm ³)	Volume total de vasos nos vilos no CG (cm ³)	11	0,652	0,030
	Peso do potro (g)	18	0,544	0,020
Volume total dos vilos (cm ³)	Volume total dos vasos nos vilos placentários (cm ³)	14	0,949	<0,001
	Volume total do parênquima nos vilos placentários (cm ³)	14	0,946	<0,001
	Volume total do epitélio nos vilos (cm ³)	14	0,944	<0,001
	Peso do potro (g)	18	0,513	0,029
	Altura da mãe (cm)	14	0,564	0,036
Volume total dos vasos no CnG (cm ³)	Altura da mãe (cm)	13	0,644	0,017
Volume total dos vasos dos vilos placentários (cm ³)	Altura da mãe (cm)	13	0,566	0,044
Volume total do parênquima dos vasos dos vilos placentários (cm ³)	PT do potro (cm)	11	0,592	0,055
	Peso do potro (g)	11	0,532	0,050
Volume total do epitélio dos vasos nos vilos placentários (cm ³)	PT do potro (cm)	14	0,554	0,077

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero). Nível de significância ($p < 0,05$).

Houve correlação entre o peso do potro e o volume total ($r=0,804$), volume dos vilos ($r=0,704$), dos vasos ($r=0,652$), e do parênquima ($r=0,770$) dos vilos placentários no CG. Foi observada correlação inversamente proporcional do peso do potro com o tempo de gestação ($r=-0,527$) e para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,543$). O PT da mãe correlacionou positivamente com o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=0,564$), tempo para reflexo de sucção ($r=0,625$), tempo para levantar ($r=0,756$) e tempo para decúbito esternal ($r=-0,590$) (Tabela 15).

O Tempo de gestação correlacionou positivamente com o PT do potro ($r=0,703$) e com o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=0,698$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Correlação entre variáveis neonatais e maternas (Peso do potro, Tempo de gestação e PT da mãe) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo primíparas das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Variável	Variável	n	r	P
Peso potro (g)	Volume do CG (cm³)	18	0,804	<0,001
	Volume total dos vilos no CG (cm³)	18	0,704	0,001
	Volume total dos vasos no CG (cm³)	18	0,652	0,030
	Volume do parênquima nos vilos placentários no CG (cm³)	18	0,770	<0,001
	Tempo de gestação (dias)	18	-0,527	0,025
	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	18	-0,543	0,020
	Tempo para mamar (min)	18	0,499	0,042
Tempo de gestação (dias)	PT do potro (cm)	12	0,703	0,011
	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	18	0,698	0,001
PT da Mãe (cm)	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	11	0,564	0,056
	Tempo para decúbito esternal (min)	11	-0,590	0,040
	Tempo para reflexo de sucção (min)	11	0,625	0,007
	Tempo para levantar (min)	11	0,756	0,048

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero). Nível de significância ($p < 0,05$).

11.2 GRUPO ÉGUAS PLURÍPARAS 2 A 5 PARTOS

Quanto as variáveis neonatais no grupo 2 a 5 partos, o peso do potro foi influenciado pelo peso ($r=0,539$) e PT maternos ($r=0,754$). Negativamente pelo volume total do parênquima e epitélio nos vilos placentários do Cut ($r=-0,900$; $r=-0,800$), e positivamente com o volume do parênquima nos vilos do CG ($r=0,770$). Foi observada correlação negativa entre o tempo de gestação e tempo para o potro apresentar reflexo de sucção ($r=-0,910$). Estabeleceu-se a relação que éguas maiores e com PT maior imprimem maior peso ($r=0,562$) e maior PT ($r=0,539$) em seus potros (Tabela 16).

Tabela 16 - Correlação entre variáveis neonatais (Tempo para reflexo de sucção) e maternas (Peso do potro, Tempo de gestação, Peso e PT da mãe) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo 2 a 5 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Variável	Variável	N	r	P
Peso potro (g)	Peso da mãe (g)	14	0,539	0,047
	PT da mãe (cm)	14	0,754	0,012
	Volume total do parênquima nos vilos placentários do Cut (cm³)	14	-0,900	0,037
	Volume total do epitélio nos vilos placentários do Cut (cm³)	14	-0,800	0,003
	Volume do parênquima nos vilos placentários do CG (cm³)	14	0,770	0,006
Tempo de gestação (dias)	Tempo para reflexo de sucção (min)	14	-0,910	0,012
	Altura da mãe (cm)	14	0,710	0,010
Peso da Mãe (g)	Peso do potro (g)	14	0,562	0,036
PT da mãe (cm)	PT do potro (cm)	14	0,539	0,047
Tempo para reflexo de sucção (min)	Tempo para mamar (min)	14	0,619	0,032

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero). Nível de significância ($p < 0,05$).

Quando avaliadas as correlações existentes no grupo 2 a 5 partos foi observado que as variáveis placentárias como o peso da membrana corioalantóide correlacionou-se negativamente com o seu próprio volume ($r=-0,896$) e positivamente com o volume total dos vasos do alantóide ($r=0,650$) e córion ($r=0,824$). O peso da membrana corioalantóide correlacionou na zona do CG com o volume total da mesoderme ($r=0,821$), parênquima ($r=-0,930$) e epitélio dos vilos placentários ($r=-0,915$), além do volume total do córion no CnG ($r=0,682$). Assim como o peso da membrana apresentou relação com o volume total ($r=0,705$) e volume total dos vasos nos vilos placentários ($r=0,928$) na região Cut (Tabela 17).

Houve correlação com o volume total da mesoderme alantóide, com a altura materna ($r=-0,646$) e com o tempo para decúbito esternal ($r=-0,646$). O volume total do parênquima nos vilos placentários do Cut correlacionou negativamente tanto com o peso da mãe ($r=-0,919$) como com o peso do potro ($r=-0,980$). Assim como, o volume total do epitélio nos vasos placentários correlacionou negativamente com o tempo de gestação ($r=-0,910$) e o volume total dos vasos nos vilos placentários com o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,910$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Correlação entre variáveis placentárias (Peso, Volume total, Volume total dos vilos, Volume total da mesoderme alantóide, Volume total do parênquima nos vilos placentários do Corpo do útero (Cut), Volume total dos vasos nos vilos, volume total do epitélio dos vilos da placentários) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais no grupo 2 a 5 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Variável	Variável	N	r	P
Peso da membrana corioalantóide (g)	Volume da membrana corioalantóide (cm ³)	14	- 0,896	<0,001
	Volume total do Cut (cm ³)	14	0,705	0,007
	Volume total da mesoderme alantóide no CG (cm ³)	14	0,821	0,001
	Volume total do córion no CnG (cm ³)	14	0,682	0,014
	Volume total do córion (cm ³)	14	0,824	0,001
	Volume total dos vasos do alantóide (cm ³)	14	0,650	0,022
	Volume total do parênquima nos vilos placentários CG (cm ³)	14	-0,930	0,022
	Volume total do epitélio nos vilos placentários do CG (cm ³)	14	-0,915	0,029
	Volume total dos vasos nos vilos do Cut (cm ³)	14	0,928	0,023
Volume total da membrana corioalantóide (cm ³)	Volume total dos vasos do alantóide (cm ³)	14	0,582	0,047
Volume total dos vilos (cm ³)	Altura da mãe (cm)	14	-0,584	0,036
	Volume total de vasos nos vilos placentários (cm ³)	14	0,842	0,036
Volume total da mesoderme alantóide (cm ³)	Altura da mãe (cm)	14	-0,646	0,023
	Tempo para decúbito esternal (min)	14	0,700	0,024
Volume total do parênquima nos vilos placentários do Cut (cm ³)	Peso da mãe (g)	14	-0,919	0,027
	Peso do potro (g)	14	-0,980	0,003
Volume total dos vasos nos vilos placentários (cm ³)	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	14	-0,910	0,012
Volume total do epitélio nos vilos placentários (cm ³)	Tempo de gestação (dias)	14	-0,910	0,012

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero)..Nível de significância ($p < 0,05$).

11.3 GRUPO ÉGUAS PLURÍPARAS 6 A 10 PARTOS

No que diz respeito ao grupo 6 a 10 partos a variável neonatal, peso do potro, foi influenciada pelo peso ($r=0,594$) e volume total ($r=0,776$) da membrana corioalantóide. Os volumes totais dos microcompartimentos mesoderme alantóide ($r=0,599$) e vilos ($r=0,578$) na zona CG também se correlacionaram positivamente ao peso do potro (Tabela 18).

O peso do potro correlacionou-se com o volume total da mesoderme alantóide no Cut ($r=0,688$), volume total do córion ($r=0,613$) e o volume total da mesoderme alantóide ($r=0,755$). O peso do potro também apresentou correlação positiva com o peso ($r=0,793$), PT ($r=0,716$) e altura ($r=0,667$) materna (Tabela 18).

Neonatos que nascem com maior peso, altura, e PT apresentaram menor tempo para levantar ($r=-0,546$; $r=-0,869$, $r=-0,892$), assim como menor tempo para eliminação do mecônio ($r=-0,535$) e para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,528$; $r=-0,881$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Correlação entre variáveis neonatais (Peso, Altura e Perímetro Torácico) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais do grupo 6 a 10 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Variável	Variável	n	r	P
Peso potro (g)	Peso da membrana corioalantóide (cm ³)	18	0,594	0,012
	Volume total da membrana corioalantóide (cm ³)	18	0,776	<0,001
	Volume total do CG (cm ³)	18	0,558	0,025
	Volume total da mesoderme alantóide no CG (cm ³)	18	0,599	0,014
	Volume total dos vilos do CG (cm ³)	18	0,578	0,001
	Volume total da mesoderme alantóide no Cut (cm ³)	18	0,688	0,002
	Volume total do córion (cm ³)	18	0,613	0,009
	Volume total da mesoderme alantóide (cm ³)	18	0,755	0,009
	Altura do potro (cm)	18	0,667	0,002
	PT do potro (cm)	18	0,728	0,017
	Tempo para levantar (min)	18	-0,546	0,029
	Tempo para eliminação do mecônio (min)	18	-0,535	0,033
	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	18	-0,528	0,029
	Tempo para levantar (min)	18	-0,869	<0,001
Altura do Potro (cm)	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	18	-0,881	0,002
PT do potro (cm)	Tempo para levantar (min)	18	-0,892	0,003

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero). Nível de significância ($p < 0,05$).

O peso da membrana corioalantóide correlacionou com seu próprio volume ($r=-0,912$), volume da mesoderme alantóide ($r=-0,835$), volume dos vasos do alantóide ($r=0,595$), volume total do córion ($r=0,644$), volume total do epitélio ($r=0,643$), peso da mãe ($r=0,690$) e do potro ($r=0,594$) (Tabela 19).

O volume total da membrana corioalantóide correlacionou com o volume total do córion do CG ($r=0,789$), volume total da mesoderme alantóide ($r=0,927$), volume total dos vilos do CnG ($r=0,486$), volume total do córion ($r=0,818$), volume total do córion no Cut ($r=0,678$), peso da mãe ($r=0,790$) e do potro ($r=0,776$), além do PT da mãe ($r=0,607$) (Tabela 19).

O volume total do CG correlacionou com volume total do parênquima ($r=-0,816$) e epitélio nos vilos placentários do CG ($r=-0,915$), tempo de gestação ($r=-0,483$), tempo para reflexo de sucção ($r=-0,672$), para mamar ($r=-0,525$), e para eliminação do mecônio ($r=-0,525$) (Tabela 19).

O volume total do córion no CG correlacionou com o peso ($r=0,617$) e PT ($r=0,669$) da mãe e peso do potro ($r=0,558$). O volume total dos vasos no CG com o peso ($r=0,912$) e PT ($r=-0,765$) do potro (Tabela 19).

O volume total do Cut correlacionou com o peso ($r=0,912$) e PT ($r=-0,765$) da mãe e o peso do potro ($r=-0,765$). O volume total do córion no Cut com o tempo para eliminação de mecônio ($r=-0,600$), peso da mãe ($r=0,597$) e do potro ($r=0,489$) (Tabela 19).

Volume total da mesoderme alantóide no Cut correlacionou com o volume total dos vasos no alantóide ($r=0,744$), peso ($r=0,839$) e PT ($r=0,780$) da mãe e peso ($r=0,688$), PT ($r=0,675$) e altura ($r=0,504$) do potro. O volume total dos vasos do alantóide no Cut com o peso ($r=0,560$) e PT ($r=0,854$) da mãe, além de PT do potro ($r=0,702$). O volume total de vilos no Cut correlacionou com o PT da mãe ($r=0,489$) (Tabela 19).

O volume total dos vilos no CnG correlacionou-se com o volume total dos vasos ($r=0,820$), peso ($r=0,530$) e altura ($r=0,545$) da mãe, peso do potro ($r=0,578$) e tempo para levantar ($r=-0,508$). Volume total de vasos no CnG com a altura da mãe ($r=0,747$) (Tabela 19).

Volume total do córion correlacionou-se com peso ($r=0,633$) e PT ($r=0,737$) da mãe e peso do potro ($r=0,613$). Volume total dos vasos nos vilos placentários com a altura da mãe ($r=0,702$), volume total dos vilos placentários ($r=0,570$) e com o peso da mãe ($r=0,570$) (Tabela 19).

Tabela 19 - Correlação entre variáveis placentárias (Peso e Volume total da membrana corioalantóide, Volume total do Corno Gestante (CG), Volume total do córion no CG, Volume total dos vasos no CG, Volume total e Volume total córion no Corpo do útero (Cut), Volume total da mesoderme e do alantóide no Cut, Volume total dos vasos do alantóide no Cut, Volume total dos vasos no Cut, Volume total dos vilos no Cut, Volume total dos vilos no Corno não Gestante (CnG), Volume total dos vasos no CnG, Volume total do córion, Volume total da mesoderme nos vilos placentários, Volume total dos vasos nos vilos placentários e Volume total da mesoderme alantóide, Volume total dos vasos nos vilos placentários, Volume total dos vilos) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais do grupo 6 a 10 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

(continua)

Variável	Variável	n	r	p
Peso da membrana corioalantóide (g)	Volume da membrana corioalantóide (cm ³)	18	-0,912	<0,001
	Volume total da mesoderme alantóide (cm ³)	18	0,835	<0,001
	Volume total dos vasos no alantóide (cm ³)	18	0,595	0,012
	Volume total do córion (cm ³)	18	0,644	0,005
	Volume total dos vasos do alantóide (cm ³)	18	0,587	0,013
	Volume total do epitélio nos vilos placentários (cm ³)	18	0,634	0,036
	Peso da mãe (g)	18	0,690	0,003
Volume total da membrana corioalantóide (cm ³)	Peso do potro (g)	18	0,594	0,012
	Volume total do córion no CG (cm ³)	18	0,789	<0,001
	Volume total da mesoderme alantóide (cm ³)	18	0,927	<0,001
	Volume total dos vilos no CnG (cm ³)	18	0,486	0,048
	Volume total de córion (cm ³)	18	0,818	0,000
	Volume total do córion no Cut (cm ³)	18	0,678	0,003
	Peso da mãe (g)	18	0,790	<0,001
Volume total do CG (cm ³)	PT da mãe (cm)	18	0,607	0,047
	Peso do potro (g)	18	0,776	<0,001
	Volume total do parênquima nos vilos placentários do CG (cm ³)	18	-0,816	0,014
	Volume total do epitélio nos vilos placentários do CG (cm ³)	18	-0,915	0,001
	Tempo de gestação (dias)	18	-0,483	0,050
	Tempo para reflexo de sucção (min)	18	-0,672	0,004
	Tempo para mamar (min)	18	-0,525	0,037
Volume total do córion no CG (cm ³)	Tempo para eliminação do mecônio (min)	18	-0,525	0,029
	Peso da mãe (g)	18	0,617	0,014
	PT da mãe (cm)	18	0,669	0,014
	Peso potro (g)	18	0,558	0,025
Volume total dos vasos nos vilos placentários do CG	Peso do potro (g)	18	0,912	0,031
	PT da potro (cm)	18	-0,765	0,027
Volume total do Cut (cm ³)	Peso da mãe (g)	18	0,665	0,005
	PT da mãe (cm)	18	0,790	0,004
	Peso potro (g)	18	0,507	0,038
Volume total do córion no Cut (cm ³)	Tempo para eliminação do mecônio (min)	18	-0,600	0,014
	Peso da mãe (g)	18	0,597	0,015
	Peso do potro (g)	18	0,489	0,046
Volume total da mesoderme alantóide no Cut (cm ³)	Volume total dos vasos do alantóide (cm ³)	18	0,744	0,001
	Peso da mãe (g)	18	0,839	<0,001
	PT da mãe (cm)	18	0,780	0,005
	Peso do potro (g)	18	0,688	0,002
	Altura do potro (cm)	18	0,504	0,026
	PT do potro (cm)	18	0,675	0,046
	Peso da mãe (g)	18	0,560	0,024
Volume total dos vasos do alantóide no Cut (cm ³)	PT da mãe (cm)	18	0,854	0,001
	PT do potro (cm)	18	0,702	0,035
	Altura da mãe (cm)	18	0,637	0,035
Volume total dos vasos nos vilos placentários do Cut (cm ³)	PT da mãe (cm)	18	0,820	0,024
	PT do potro (cm)	18	0,834	0,039
	Tempo para levantar (min)	18	-0,617	0,043
	PT da mãe (cm)	18	0,489	0,046
Volume total dos vilos no Cut (cm ³)				
Volume total dos vilos no CnG (cm ³)	Volume total dos vasos (cm ³)	18	0,820	0,002
	Peso da mãe (g)	18	0,530	0,035
	Altura da mãe (cm)	18	0,545	0,029
	Peso do potro (g)	18	0,578	0,015
	Tempo para levantar (min)	18	-0,508	0,044
Volume total dos vasos no CnG (cm ³)	Altura da mãe (cm)	18	0,747	0,005
Volume total do córion (cm ³)	Peso da mãe (g)	18	0,633	0,010

(conclusão)

	PT da mãe (cm)	18	0,737	0,010
	Peso do potro (g)	18	0,613	0,009
Volume total da mesoderme	Peso da mãe (g)	18	0,700	0,003
alantóide (cm ³)	Peso do potro (g)	18	0,755	<0,001
Volume total dos vasos nos	Altura da mãe (cm)	18	0,702	0,016
vilos placentários (cm ³)				
Volume total dos vilos (cm ³)	Peso da mãe (g)	18	0,570	0,019

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero). Nível de significância ($p < 0,05$).

O tempo de gestação correlacionou com o PT do potro ($r=0,850$) e tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,665$). O peso da mãe correlacionou com o peso ($r=0,793$), altura ($r=0,540$) e PT do potro ($r=0,721$). O PT da mãe também correlacionou-se com o peso ($r=0,716$), altura ($r=0,598$) e PT ($r=0,728$) do potro (Tabela 20).

Tabela 20 - Correlação entre variáveis maternas (Tempo de gestação, Altura e Perímetro Torácico das mães) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais do grupo 6 a 10 partos das éguas Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Variável	Variável	n	r	p
Tempo de gestação (dias)	PT do potro (cm)	18	0,850	0,002
	Tempo para ruptura do cordão umbilical (min)	18	-0,665	0,004
Peso da mãe (g)	Peso do potro (g)	18	0,793	<0,001
	Altura do potro (cm)	18	0,514	0,035
	PT do potro (cm)	18	0,721	0,029
PT da mãe (cm)	Peso do potro (g)	18	0,716	0,009
	Altura do potro (cm)	18	0,598	0,040
	PT do potro (cm)	18	0,728	0,026

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante) e Cut (corpo do útero). Nível de significância ($p < 0,05$).

A tabela 21 identifica as correlações significativas com as variáveis paternas e evidencia-se uma correlação positiva da idade paterna com o peso ($r= 0,394$) e PT ($r=0,425$) do potro, assim como o volume total do CG ($r=0,415$) e volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG ($r=0,464$).

O peso paterno correlacionou com o Volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG ($r=0,393$) e o PT do garanhão correlacionou com o peso ($r=0,316$) e PT ($r=0,425$) do potro volume total do CG ($r=0,319$) e volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG ($r=0,384$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Correlação entre variáveis paternas (Idade, Peso e Perímetro Torácico dos garanhões) com as variáveis maternas, placentárias e neonatais dos animais Puro Sangue Inglês - São Paulo – 2013

Variável	Variável	n	r	p
Idade do Pai (anos)	Peso do potro (g)	50	0,394	0,004
	PT do potro (cm)	28	0,425	0,030
	Volume total do CG (cm ³)	48	0,415	0,003
	Volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG (cm ³)	32	0,464	0,007
Peso do pai (g)	Volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG (cm ³)	32	0,393	0,030
PT do pai (cm)	Peso do potro (g)	50	0,316	0,020
	PT do potro (cm)	28	0,425	0,020
	Volume total do CG (cm ³)	48	0,319	0,020
	Volume total do parênquima nos vilos placentários do CnG (cm ³)	32	0,384	0,020

PT (perímetro torácico), CG (corno gestante), CnG (corno não gestante). Nível de significância ($p < 0,05$).

12 DISCUSSÃO

Este trabalho buscou obter relações práticas entre as variáveis maternas, paternas e placentárias, com influencia sobre variáveis biométricas e de vitalidade do neonato equino. Objetivando responder a questionamentos do mercado pela busca de animais com melhor desenvolvimento e consequente desempenho futuros.

Assim, no que diz respeito às correlações de variáveis placentárias, no grupo primíparas, o peso da membrana corioalantóide correlacionou positivamente com os volumes totais do córion ($r=0,774$). O peso da membrana corioalantóide também correlacionou com o volume total dos vilos ($r=0,649$), parênquima ($r=0,592$), epitélio ($r=0,725$) e vasos ($r=0,579$) nos vilos placentários. Membranas corioalantóides mais pesadas apresentam maior estrutura expressa em maiores volumes nas diversas estruturas dos vilos placentários.

Da mesma forma que o peso do potro foi influenciado pelo volume total do epitélio dos vasos nos vilos placentários ($r=0,532$) e volume total do córion no CnG. O volume total dos vilos correlacionou com os volumes totais dos vasos ($r=0,949$), parênquima ($r=0,946$) e epitélio ($r=0,944$) nos vilos placentários. Para maior produção de Kg de potro é necessário que haja maior volume de estruturas para trocas na interface materno fetal, assim pode ocorrer um aumento estrutural nos microcotilédones, principalmente quanto ao volume de vasos nos vilos placentários. Vilos e microvilos constituem a área de maior contato, fornecendo ampla superfície para trocas (BROLIO et al., 2010). Culminando em uma maior disponibilidade de extensão de membrana para o funcionamento de transportadores importantes, como transportadores de glicose, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros, na busca de maior eficiência na produção de potros. Apesar da transferência placentária não ser dependente somente da extensão da barreira, mas também de sua espessura, gradiente de concentração e mecanismos de transmissão ativa (BROLIO et al., 2010).

Éguas mais pesadas e com PT maior imprimiram maior peso ($r=0,562$) e maior PT ($r=0,539$) em seus potros. Membranas corioalantóides mais pesadas e com maiores volumes de estruturas, podem gerar potros de maior estrutura física, inclusive no que diz respeito à adaptação pós-natal. Neonatos mais bem desenvolvidos, com peso e PT adequado, apresentam reflexo de sucção entre meia hora à uma hora após o parto. Um reflexo fraco pode estar associado à prematuridade e algumas vezes até afecções. Principalmente quando os potros têm variáveis biométricas diminuídas, em média menores que 10% do peso da égua. (KURTZ FILHO et al., 1997).

No que diz respeito às correlações neonatais, no grupo primíparas, o peso da membrana corioalantóide apresentou correlação com variáveis como peso ($r=0,598$), PT ($r=0,775$), tempo para mamar ($r=0,553$) e correlação negativa com o tempo de gestação ($r=-0,527$). Elliott, Morton e Chopin, (2009) afirmam que acima de uma linha de corte de 6,5 Kg de peso do corioalantóide, a cada um Kg de peso da membrana aumenta 4,5 Kg de peso do potro, contudo a relação não é linear, assim quando há um aumento muito grande no peso da membrana corioalantóide a relação estabelece um platô. Quanto à idade da mãe, para cada ano extra de vida, ocorre um aumento de 0,5 Kg no peso do potro e 0,04 Kg no peso da membrana. Da mesma forma quanto à paridade, a cada potro extra, há um aumento no seu peso de 0,8 Kg e aumento de 0,06 Kg no peso da membrana corioalantóide.

Em suma o peso do corioalantóide e a paridade explicam 24,4% da variação do peso do potro ao nascimento. O maior efeito da paridade sobre o peso do potro observada por Elliott, Morton e Chopin, (2009) foi para o grupo primíparas. Os autores encontraram, nesse grupo, menor peso do corioalantóide e sugerem que o peso do potro tende a aumentar com a paridade, até atingir um platô entre 10 e 15 anos. Concordando com os dados de Wilsher e Allen (2000) que afirmam que a primiparidade é mais importantes para determinar o peso do potro devido à redução da densidade de superfície dos microcotilédones, menor volume do córion e consequente menor área de troca.

O PT do potro apresentou correlação com os volumes totais da membrana corioalantóide ($r=0,704$), mesoderme alantóide do CG ($r=0,544$), além do parênquima ($r=0,592$) e epitélio ($r=0,554$) dos vasos nos vilos placentários. Também foi observada correlação entre o peso do potro e volume total ($r=0,804$), volume dos vilos ($r=0,704$), dos vasos ($r=0,652$), e do parênquima ($r=0,770$) do CG. Correlações descritas entre peso do potro e área de contato materno fetal, representada pelas estruturas dos vilos placentários, demonstram que o crescimento *in utero* é governado pelo tamanho real da placenta e sua competência, que por sua vez é governada pela área viável do endométrio como sugerido por Wilsher e Allen (2000).

O volume total do CG correlacionou inversamente com o tempo de gestação ($r=-0,577$) e diretamente como peso do potro ($r=0,704$). Podemos inferir que potros que contaram com um maior espaço intrauterino, puderam ter um maior desenvolvimento, culminando em potros maduros no tempo normal de gestação.

Da mesma forma que mães mais altas apresentaram volumes totais dos vasos no CnG ($r=0,564$), vasos ($r=0,644$), e parênquima ($r=0,566$) nos vilos placentários maiores. O Tempo de gestação correlacionou positivamente com o PT do potro ($r=0,703$), e negativamente com

o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,543$). Quando maior o tempo de gestação menor o tempo para reflexo de sucção ($r=-0,910$). Assim, corroboramos com os dados de Veronesi et al. (2010), que observaram que o tempo de gestação tem forte correlação com a densidade de superfície dos vilos.

Com uma maior área de contato é de se esperar que haja o desenvolvimento de um potro maior em peso e PT. Veronesi et al. (2010) cita que em mulheres, o aumento do tempo de gestação resulta em contínuo desenvolvimento das sub-ramificações dos vilos, a mesma constatação já foi observada em equinos. Anteriormente acreditava-se que os microcotilédones atingiam um platô de crescimento, contudo os dados encontrados por Wilsher e Allen (2003) determinaram que há contínuo aumento da complexidade dos microcotilédones, e que esse fator está inversamente relacionado a eficiência placentária.

No que diz respeito às variáveis neonatais no grupo 2 a 5 partos, o peso do potro correlacionou com o volume total ($r=0,804$), volume dos vilos ($r=0,704$), dos vasos ($r=0,652$), e do parênquima ($r=0,770$) nos vilos placentários na zona CG. Rossdale (2004), afirma que um ambiente uterino desfavorável, com comprometimento da circulação materno-fetal pode impor limites ao desempenho atlético futuro dos potros. Assim correlações com as estruturas nos vilos placentários, principalmente quanto a vasos é pertinente para determinar potencial nutrição do feto. Hintz, Hintz e Van Vleck (1979) afirmam que potros que nascem com peso baixo tem desenvolvimento insatisfatório nas pistas, afirmando que o número de gestações possa ser o principal fator limitante.

Ainda quanto as variáveis neonatais no grupo 2 a 5 partos, o peso do potro foi influenciado pelo peso ($r=0,539$) e PT materno ($r=0,754$). Negativamente pelo volume total do parênquima e epitélio nos vilos placentários na zona Cut ($r=-0,900$; $r=-0,800$), e positivamente com o volume do parênquima nos vilos placentários na zona CG ($r=0,770$). O crescimento do potro reflete a área disponível no CG, podemos relacionar a forte correlação negativa com o Cut, devido a competição em proporção por espaço intrauterino com o CG. Garcia et al. (2011) afirmam que há tendência dos animais vencedores em corridas já nascerem maiores e mais pesados, ainda afirmam que essa diferença permanece até os 18 meses.

O PT da mãe correlacionou positivamente com o tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=0,564$), reflexo de sucção ($r=0,625$) e tempo para levantar ($r=0,756$). Podemos afirmar que animais provenientes de éguas com maior desenvolvimento torácico se apresentam mais hábeis nas primeiras adaptações pós-natal, resultando em melhores parâmetros de vitalidade neonatal.

O Tempo de gestação correlacionou positivamente com o PT do potro ($r=0,703$) e tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=0,698$), corroborando com os achados de Veronesi et al. (2005) que afirmam haver correlação positiva entre tempo de gestação e variáveis neonatais.

No que diz respeito às variáveis neonatais, no grupo 6 a 10 partos, o peso do potro, foi influenciado pelo peso ($r=0,594$) e volume total ($r=0,776$) da membrana corioalantóide, resultados também observado por Wilsher e Aillen (2003); Navarrete et al. (2005) e Veronesi et al. (2010). Sugerindo que medidas placentárias maiores fornecem um ambiente mais adequado para o desenvolvimento fetal. Em especial neste grupo, fêmeas que gestaram de 6 a 10 vezes, resultando em uma distensão natural dos compartimentos uterinos, permitindo um maior crescimento e ganho de peso fetal.

Os volumes totais dos microcompartimentos, mesoderme alantóide ($r=0,599$) e vilos ($r=0,578$) na zona CG além do volume total da mesoderme alantóide no Cut ($r=0,688$), volume total do córion ($r=0,613$) e volume total da mesoderme alantóide ($r=0,755$) correlacionaram-se positivamente com o peso do potro. A produção de potros de maior peso pode estar relacionada a um possível melhor aporte nutricional obtido pelo maior volume dos vilos e da mesoderme alantóide, como tecido de sustentação e promoção de irrigação através dos vasos do alantóide. Corroborando com as informações que o crescimento e o desenvolvimento do feto dependem do adequado desenvolvimento placentário (Reimer, 1997). O mesmo autor correlaciona diretamente o tamanho do feto e a superfície placentária.

Nas fêmeas pluríparas de 6 a 10 partos, o peso do potro também apresentou correlação positiva com o peso ($r=0,793$) e PT ($r=0,716$) da mãe corroborando com Wilsher e Allen (2000), que também encontraram correlação positiva entre peso materno e peso do potro ao nascimento. Podemos inferir que mães com maior desenvolvimento corporal, principalmente no que diz respeito a PT maior, podem responder com maior capacidade cardiopulmonar à gestação de seus potros. Segundo Brolio et al. (2010), o fluxo sanguíneo útero placentários em mulheres gestantes, representa cerca de 20 a 25% do débito cardíaco, esse aumento no fluxo sanguíneo aumentar a tensão de oxigênio para o feto. O taxa de fluxo sanguíneo entre mãe e feto na espécie equina pode chegar a 2200 mililitros por minutos, no final na gestação (FOWDEN et al., 2002). Imprimindo maior suprimento sanguíneo para o feto, culminando em potros mais pesado.

Neonatos que nascem com maior peso, altura, e PT apresentaram menor tempo para levantar ($r=-0,546$; $r=-0,869$, $r=-0,892$), menor tempo para eliminação do mecônio ($r=-0,535$) e para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,528$; $r=-0,881$). Sugerindo que esses potros nascem

mais capazes de se adaptar ao meio extrauterino, em contrapartida a aqueles que nascem com baixo peso, evitando assim uma série de complicações neonatais.

O maior volume total dos vasos no CG imprime um maior peso no potro ($r=0,912$), volume total do córion ($r=0,613$) e mesoderme alantóide ($r=0,755$) no CG. O aumento do volume da composição estrutural da membrana corioalantóide, pode gerar maior área de contato entre mãe e feto justificando maiores trocas nutricionais e um potro de maior peso no grupo avaliado, respaldado nas informações de Allen et al. (2002) e Veronesi et al. (2010) observaram uma correlação entre características placentárias e características dos potros ao nascimento.

Nas fêmeas pluríparas com 6 a 10 partos houve correlação entre o peso da membrana e os volumes das microrregiões, com exceção do volume total dos vilos, apesar do aumento do volume total do epitélio nos vilos placentários ($r=0,634$), talvez por um mecanismo compensatório devido à diminuição da área disponível para placentação associada a uma menor densidade de superfície dos microcotilédones, assim o aumento no volume do epitélio nos vilos fornece maior área de troca, aumentando área bruta de absorção.

Da mesma maneira que as membranas corioalantóides com volumes totais maiores correlacionaram-se com maiores volumes totais do córion ($r=0,789$), vilos ($r=0,486$) e córion ($r=0,678$) no CG, CnG e Cut respectivamente. Gerando maiores volumes gerais de córion ($r=0,818$) e mesoderme alantóide ($r=0,927$). Com o aumento do peso e volume da membrana, há uma necessidade estrutural maior, representadas pelos maiores volumes do córion e mesoderme alantóide, fornecendo mais substrato para crescimento fetal. Compilando no maior peso do neonato ao nascimento ($r=0,594$; $r=0,776$), justamente crias derivadas de mães com peso ($r=0,690$; $0,790$) e PT maiores ($r=0,607$).

O maior volume total do CG resultou em menor volume total do parênquima ($r=-0,816$) e epitélio ($r=-0,915$) nos vilos placentários nesta região, provavelmente devido à distensão da parede do corno para suportar o crescimento fetal. Rice (1998) considera o envolvimento de várias vias no desenvolvimento da gestação. Remodelação do útero para acomodar o crescimento fetal e placentário associados, tecidos e fluidos podem representar um mecanismo estimulatório que contribui para o concomitante crescimento uterino, dessa forma o feto pode ser primariamente responsável por este crescimento, ressaltando mais uma vez que o fenótipo do feto é um significante fator para determinar a área do corioalantóide.

O tempo de gestação é considerado um critério acurado de avaliação da viabilidade fetal, para a classificação da necessidade de intervenção em fetos dismaturos (KOTERBA, 1990). O tempo de gestação ($r=-0,483$) foi menor em volumes maiores do CG, essa diferença

pode ser devido ao espaço adequado ao desenvolvimento fetal, culminando em potros de maior PT ($r=0,850$), os neonatos apresentaram-se bem desenvolvidos próximo ao período normal de gestação, não havendo problemas de prolongamento da gestação ou fetos prematuros e dismaturos. Apesar de Kurtz et al. (1997) e Elliott, Morton e Chopin (2009) afirmarem não haver associação significativa entre tempo de gestação e variáveis neonatais.

Allen, et al. (2002) estudaram o desenvolvimento de embriões provenientes de animais de maior porte quando transferidos a receptoras de menor porte, demonstraram vários graus de subdesenvolvimento muscular. Contudo quando a condição foi contrária, o feto com maior espaço intrauterino, apresentou hiperflexão do boleto, além de pelos mais desenvolvidos ao nascimento.

Rossdale et al. (1984) também demonstraram que embriões de raças de maior porte quando transferidos para raças de menor porte necessitaram de maiores cuidados neonatais nas primeiras 24 horas de vida, em contraste aos animais que contaram com um ambiente uterino maior, apresentaram-se maiores e fisicamente maduros. Em nossos resultados, tal observação pode ser pautada no menor tempo observado para o neonato apresentar reflexo de sucção ($r=-0,672$), mamar ($r=-0,525$) e eliminar o mecônio ($r=-0,525$) além do maior tempo para ruptura do cordão umbilical ($r=-0,665$) assegurando que um maior volume de sangue possa ser passado para o potro após o parto. Rossdale e Mahaffey em 1958 descreveram que a quantidade de sangue que pode passar do corioalantóide para o neonato, em média é de um litro a um litro e meio, quando a ruptura ocorre de forma natural e mais tardiamente. Knottenbelt (2003) considera essencial o não rompimento imediato do cordão, garantindo que o potro receba mais volume de sangue. Doarn, Threfall e Kline (1987) ainda justificam que a não passagem desse volume de sangue pode refletir na alteração dos padrões hematológicos do potro. Contudo Kurtz Filho et al. (1997) não acreditam que a ruptura imediata do cordão umbilical influencie na adaptação pós uterina do potro, nem mesmo que seja necessário a passagem de sangue extra para o neonato.

No que diz respeito a variáveis maternas no grupo 6 a 10 partos, o peso e PT da mãe correlacionam positivamente com o maior volume total do córion no CG, com volume total ($r=0,617$; $0,669$) e volume do córion ($r=0,633$). O peso e PT das mães também correlacionaram-se com o volume total da mesoderme alantóide ($r=0,839$; $0,780$), volume total de vasos do alantóide ($r=0,637$; $0,820$) e vilos ($r=0,489$) na zona Cut. Além do volume total dos vilos ($r=0,530$; $0,545$) e vasos ($r=0,747$) na zona referente ao CnG. Allen et al. (2002) observaram que mães mais pesadas apresentaram área de contato materno fetal maior. Esta correlação sugere que mães de maior estrutura física (peso, PT e altura) constituem a

membrana corioalantóide com maiores volumes de estruturas para constituição da unidade funcional placentária que é o microcotilédone. Independente da zona de localização, pois a própria característica da placenta equina, do tipo difusa, sugere captação dos nutrientes via fluxo sanguíneo em todas as suas regiões.

Relação interessante foi observada entre o volume total do CG e volume total do parênquima nos vilos na região do CnG com variáveis paternas como idade, peso e do PT, assim como garanhões com maior peso e maior PT imprimem um volume maior de CG, resultando em maior espaço para o crescimento e desenvolvimento fetal, gerando potros mais desenvolvidos fisicamente e com maior peso. Resultados ainda não mencionados em outros estudos relacionados a variáveis placentárias, paternas e neonatais em equinos.

As variáveis paternas também correlacionam com o peso e PT dos potros, apesar do coeficiente de correlação mais baixo. Assim garanhões com maior idade, peso e PT imprimem um maior volume de CG ($r=0,415$; $r=0,425$) e maior volume das microestruturas placentárias ($r=0,465$; $r=0,393$; $r=0,319$) resultando em maior espaço para o crescimento e desenvolvimento fetal, gerando potros mais desenvolvidos fisicamente e com maior peso ($r=0,394$; $r=0,316$) e PT ($r=0,425$; $r=0,316$). Satué et al. (2011), relataram que o garanhão influencia no tempo de gestação, provavelmente respaldados em sua estrutura física. Contudo a real relação ainda permanece obscura, o mesmo autor ressalva que garanhões que imprimem maior tempo de gestação devem ser utilizados no início da estação de monta e fim de equilibrar o tempo de gestação.

O garanhão é um importante colaborador no desempenho reprodutivo de um haras, um garanhão subfértil pode comprometer em grande escala o programa reprodutivo do estabelecimento (CURY, 1989), os machos produzem maior número de filhos por ano, devido ao sistema de monta estabelecido para cada raça, desta forma é importante uma pressão de seleção maior no macho (MOTA, 1996). Assim o estabelecimento de correlações que reflitam em desenvolvimento placentário e neonatal, podem ser pertinentes para auxiliar na seleção dos melhores garanhões em determinados acasalamentos.

Não foram encontrados relatos na literatura de avaliações dos diferentes pontos da membrana corioalantóide do mesmo animal, e possíveis correlações, quanto às variáveis morfométricas, variáveis maternas, neonatais e principalmente paternas. Tendo em vista que os produtores de equinos de corrida, não dispõem de muitos subsídios para a seleção de reprodutoras, a maior parte dos critérios de seleção é baseada em dados empíricos ou históricos das fêmeas (BRITO et al., 2000). Com o agravante que em algumas raças como o caso do Puro Sangue Inglês, não é permitido a utilização de biotécnicas da reprodução como a

Transferência de Embriões o que faz com que as matrizes devam ser provadas genética e atleticamente e ainda tenham “tempo” disponível e ambiente uterino adequado para a gestação.

Assim, correlações como as abordadas neste trabalho podem fornecer ferramentas práticas relevantes para auxiliar na escolha das fêmeas e machos mais indicados para geração de potros com possíveis qualidades atléticas superiores.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A pluriparidade influencia positivamente o peso ao nascimento dos potros na raça Puro Sangue Inglês.
- A avaliação morfofuncional da placenta evidenciou que o aumento da paridade é determinante para ganho de eficiência placentária.
- As membranas corioalantóides das éguas pluríparas tendem a apresentar maior volume total do compartimento gestante, aumento na porcentagem de vilos, volume total de vilos, além de maior densidade microcotiledonária e expressão do VEGF na região do Corno Gestante da membrana corioalantóide a termo.
- A densidade de superfície dos vilos foi menor nas éguas pluríparas, apesar da tendência a microcotilédones mais altos e com bases mais amplas no Corno Gestante e Corno não Gestante.
- O grupo primípara apesar de possuir a maior composição estrutural para trocas no Corpo do útero e maior densidade de superfície dos vilos, não gera potro de maior peso, tampouco aumenta a expressão de fatores angiogênicos, culminando em uma menor eficiência placentária. Assim, podemos estabelecer a provável relação que uma menor densidade de superfície determina uma maior eficiência placentária.
- Correlações como as abordadas neste trabalho podem fornecer ferramentas práticas relevantes para auxiliar na escolha das fêmeas e machos mais indicados para geração de potros com possíveis qualidades atléticas superiores.

REFERÊNCIAS

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. Development *in utero*. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 445-453, Mar. 2002.

BRITO, E. **Análise de características parentais e do produto no desempenho esportivo de cavalos Puro Sangue de corrida**. 2000. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2000.

BROLIO, M. P.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. C.; MORINI, A. C.; GUERRA, M. A.; MIGLINO, M. A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 4, p. 222-232, Out./Dez. 2010.

DAVIS-MOREL, M. C.; NEWCOMBE, J. R.; HOLLAND, S. J. Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. **Animal Reproductive Science**, New York, v. 74, n. 3-4, p. 175-185, Aug. 2002.

DOARN, R. T.; THREFALL, W. R. KLINE, R. Umbilical blood flow and the effects of premature severance in the neonatal horse. **Theriogenology**, Stonenham, v. 28, n. 6, p. 789-800, Dec. 1987.

ELLIOTT, C.; MORTON, J.; CHOPIN, J. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. **Theriogenology**, Stoneham, v.71, n.4, p.683-689, Mar. 2009.

GARCIA, F. P. S.; ALFAYA, H.; LINS, L. A.; VELHO, J. R.; NOGUEIRA, C. E. W. Influência da idade materna e número do parto no desempenho de cavalos puro sangue Inglês criados em Bagé-RS. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 110, p. 39-42, 2011.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**: three-dimensional measurement in microscopy. 2. ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific, 2005. p.103-117.

HINTZ, H. F.; HINTZ, R. L.; VAN VLECK, L. D. Growth rate of Thoroughbreds. Effect of age of dam, year and month of birth, and sex of foal. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 48, p. 480-487, Jan. 1979.

KNOTTENBELT, D. C. **Equine stud farm medicine and surgery**, 3. ed. Edinburgh: Saunders, 2003.402 p.

KOTERBA, A. M. Physical examination. In: KOTERBA, A. M.; DRUMMOND, W. H.; KOSCH, P. C. **Equine Clinical Neonatology**. Lea; Febiger, Philadelphia, London, p.71-83, 1990.

KURTZ FILHO, M.; DEPRH, N. M.; ALDA, J. L.; CASTRO, I. N. DE LA CORTE, F. D.; SILVA, C. A. M. Duração da gestação em relação a idade de éguas da raça Puro Sangue de corrida, aos pesos dos potros e da placenta, e ao horário do parto. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 37-40, 1997.

MARTENIUK, J. V.; CARLETON, C. L.; LLOYD, J. W.; SHEA, M. E. Association of sex of fetus, sire, month of conception, or year of foaling with duration of gestation in Standardbred mares. **Journal American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 212, n. 11, p. 1743-1745, June. 1998.

MAYHEW, T. M. Stereology and the placenta: where's the point? A review. **Placenta**, London, v. 27, p. 17-25, Apr. 2006, Supplement A.

MAYHEW, T. M.; JENKINS, H.; TODD, B.; CLIFTON, V. L. Maternal asthma and placental morphology: effects of severity, treatment and fetal sex. **Placenta**, London, v. 29, n. 4, p. 366-373, Apr. 2008.

MOTA, M. D. S. **Estudo genético-quantitativo de características ligadas ao desempenho de corridas de cavalos Puro Sangue Inglês**. 100f. Tese (Doutorado em zootecnia) - Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

NAVARRETE, K. R.; MUNOZ, A. L.; SARAIVA, R. F.; SANTA MARIA, S. A.; QUEZADA, O. M. Determination of normal weight of the allantochorion in Holsteiner mares. **Avances em Ciencias Veterinarias**. Chile, v. 20, n. 1-2, p. 61-66, Nov. 2005.

RICE, G. Mechano-transcription pathways involved in determining placental size. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 30, n. 6, p. 457 1998. Abstract.

RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra-som em equinos**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006.

ROSSDALE, P. D.; MAHAFFEY, L. W. Parturition in thoroughbred mares with parturition

references to blood deprivation in the newborn. **Veterinary Record**, v. 70, p. 142-152, 1958.

ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C.; SILVER, M.; FOWDEN, A. Studies on equine prematurity 6: guidelines for assesment of foal maturity. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 16, n. 4, p.300-302, July. 1984.

ROSSDALE, P.D. The maladjusted foal: influences of intrauterine growth retardation and birth trauma. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2004, Lexington, Kentucky. **Proceedings...** Lexington, Kentucky: AAEP, 2004. v. 50, p. 75-126.

SATUÉ, K.; FELIPE, M.; MOTA, J.; MUÑOZ, A. Gestational length in Carthusian broodmares: affecets of breeding season, foal gender, age of mare, year of parturition, parity and sire. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 14, n. 2, p. 173-180, Aug. 2011.

VERAS, M. M.; DAMACEN-RODRIGUES, N. R.; CALDINI, E. G.; RIBEIRO, A. A. C. M.; MAYHEW, T. M.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHONIKOFF, T. Particulate urban air affects the functional morphology of the mouse placenta. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 79, n. 3, p. 578-584, Sept. 2008.

VERONESI, M. C.; RICCABONI, M.; FAUSTINI, M.; BATTOCCHIO, F.; CAIROLI, F.; VILLANI, M. Potencial association between placental features and Apgar scores after normal parturition in the thoroughbred horse. *Journal of Animal and veterinary Advances*, Faisalabad, v. 4, n. 12, p. 965-970, Apr. 2005.

VERONESI, M.C; VILLANI, M.; WILSHER, S.; CONTRI, A.; CARLUCCIO A. A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 4, p. 627-631, Sep. 2010.

YAMAMOTO, O.; ASAI, Y.; KUSUNOSE, R. Effects of sex, birth month, parity, weight of dam and farm on the growth of Thoroughbred foals and yearlings. **Animal Science and Technology**, Japan, v. 64, n. 5, p. 491-498, May. 1993.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANFER. HAVEMEYER FOUNDATION, 5., 2000, Saari, Finland. **Proceedings...** Saari, Finland, 2000. p. 74-75.

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