

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Cliniche Veterinarie

Ciclo XXIV

**Settore Concorsuale di afferenza:**

07/H5 – CLINICHE CHIRURGICA E OSTETRICA VETERINARIA

**Settore Scientifico disciplinare:**

VET/10 – CLINICA OSTETRICA E GINECOLOGIA VETERINARIA

TITOLO TESI

INSUFFICIENZA PLACENTARE NELLA SPECIE  
EQUINA

**Presentata da: Dott. Alessandro Pirrone**

**Coordinatore Dottorato**

Prof. Paolo Famigli Bergamini

**Relatore**

Prof. Carolina Castagnetti

**Esame finale anno 2012**

## INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 5
<b>SEZIONE A: APPROFONDIMENTO BIBLIOGRAFICO</b>	
<b>CAPITOLO 1: LA PLACENTA EQUINA</b>	<b>6</b>
1.1 FORMAZIONE DELLA PLACENTA	6
1.1.1. Trasporto nell'ovidutto	6
1.1.2. Riconoscimento materno di gravidanza	6
1.1.3. Embriogenesi e sviluppo degli invogli	7
1.1.4. Reazione delle coppe endometriali	8
1.1.5. Placentazione	11
1.2. MORFOLOGIA DELLA PLACENTA	15
1.2.1. Forma e peso	15
1.2.2. Sacco Vitellino	15
1.2.3. Allantocorion	16
1.2.4. Allantoamnios	17
1.2.6. Cordone ombelicale	18
1.3. LIQUIDI FETALI	18
1.3.1. Liquido allantoideo	18
1.3.2. Liquido amniotico	19
1.4. FUNZIONI ENDOCRINE DELLA PLACENTA	20
<b>CAPITOLO 2: SCAMBI PLACENTARI E NUTRIZIONE DEL FETO</b>	<b>24</b>
2.1. DIREZIONE DEL FLUSSO SANGUIGNO NEL MICROCOTILEDONE	24
2.2. METABOLISMO OSSIDATIVO	26
2.3. CARBOIDRATI	27
2.3.1. Glucosio	27
2.3.2. Lattato	28
2.4. AMMINOACIDI	30

2.5. ACIDI GRASSI	Pag. 31
<b>CAPITOLO 3: PATOLOGIE DEGLI INVOGLI FETALI</b>	32
3.1. IPOPLASIA DEI VILLI CORIALI	32
3.2. PLACENTITE	33
3.3. ANOMALIE DEL CORDONE OMBELICALE	34
3.4. CONSEGUENZE DELL'INSUFFICIENZA PLACENTARE	35
<b>CAPITOLO 4: INDAGINI CLINICHE PER L'INDIVIDUAZIONE DEL PULEDRO A RISCHIO</b>	41
4.1. MONITORAGGIO DELLA GRAVIDANZA	41
4.1.1. Profilo ormonale	42
4.1.2. Concentrazione degli elettroliti mammari	44
4.1.3. Monitoraggio ecografico	44
4.2. ESAME MACROSCOPICO DEGLI INVOGLI	51
4.2.1. Artefatti	53
4.2.2. Aspetto macroscopico patologico	55
4.3. ESAME CLINICO	57
4.4. PARAMETRI EMATOBIOCHIMICI	62
4.4.1. Ematocrito	62
4.4.2. MCV	63
4.4.3. Eritrociti	63
4.4.4. Leucociti	64
4.4.5. Piastrine	65
4.4.6. Proteine totali	66
4.4.7. Fibrinogeno	66
4.4.8. Glucosio	66
4.4.9. Lattato	67
4.4.10. Creatinina e Urea	68

## **SEZIONE B: PROVE SPERIMENTALI**

<b>CAPITOLO 5</b>	Pag. 70
5.1. SCOPI DEL LAVORO	70
5.2. MATERIALI E METODI	72
5.2.1. SELEZIONE DEGLI ANIMALI	72
5.2.2. RACCOLTA DEI DATI E DETERMINAZIONI EMATOBIOCHIMICHE	72
5.2.3. ANALISI STATISTICA	79
5.3. RISULTATI	83
5.4. DISCUSSIONE	104
5.5. CONCLUSIONI	114
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	116

## **INTRODUZIONE**

Lo sviluppo e la funzionalità della placenta influenzano direttamente la crescita ed il benessere del feto all'interno dell'utero, quindi qualsiasi problema strutturale o funzionale della placenta influenzerà lo sviluppo del feto. Il termine disfunzione placentare indica un fallimento della placenta nel soddisfare le crescenti esigenze metaboliche del feto con il progredire della gravidanza. Tutte le patologie che interessano l'unità utero-placentare, come per esempio le placentiti, possono causare una riduzione dell'apporto di nutrienti ed ossigeno al feto stesso con conseguenti alterazioni dello sviluppo e della crescita; questo, nei casi più gravi, può portare ad aborto o prematurità, ma più spesso causa la nascita di puledri dismaturi e/o affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale.

Il fallimento della placenta nel soddisfare le richieste di ossigeno e substrati comporta una serie di risposte fetali compensatorie. Il feto umano possiede sistemi ben sviluppati di risposta cardiovascolare per proteggere gli organi vitali dagli effetti negativi dell'ipossia e dell'asfissia.

L'asfissia intrauterina altera il metabolismo acido-base, causando una acidosi metabolica con conseguente danno cellulare in diversi organi quali il cuore, i reni, il fegato ed il cervello.

La comprensione di queste risposte e delle loro manifestazioni cliniche è importante per l'ottimizzazione della gestione clinica e per la scelta degli interventi terapeutici in questo processo fisiopatologico.

## **SEZIONE A: APPROFONDIMENTO BIBLIOGRAFICO**

### **CAPITOLO 1: LA PLACENTA EQUINA**

#### 1.1 FORMAZIONE DELLA PLACENTA

##### *1.1.1 Trasporto nell'ovidutto*

Avvenuta la fusione tra spermatozoo capacitato e cellula uovo, lo zigote deve attraversare l'ovidotto per raggiungere l'utero nel quale impiantarsi. Nella specie equina, per compiere questo tragitto è necessario un tempo piuttosto lungo e solo dopo 6-7 giorni dall'ovulazione lo zigote raggiunge l'utero (Allen, 2001). Solo gli embrioni entrano nella cavità uterina; gli oociti non fecondati vengono ritenuti nelle tube uterine. Dal raggiungimento dello stadio di morula compatta fino al quinto giorno circa, l'embrione è in grado di secernere  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . L'azione locale delle prostaglandine promuove il rilascio della muscolatura liscia dell'ovidotto favorendo la progressione e l'arrivo in utero dell'embrione circa 24 ore dopo; quindi è proprio questa capacità secretoria che assicura il raggiungimento dell'utero (Allen, 2001).

##### *1.1.2 Riconoscimento materno di gravidanza*

La presenza del corpo luteo e la sua continua secrezione di progesterone sono necessari per il proseguimento della gravidanza. Il riconoscimento materno della gravidanza avviene in maniera del tutto particolare nella specie equina. A differenza di altre specie, l'embrione rimane sferico per la presenza della capsula fino a circa il giorno 21, quando la capsula viene persa, ed in questo modo è libero

di muoversi spinto dalle contrazioni peristaltiche del miometrio, segnalando così la presenza del conceptus a tutto l'endometrio (Ginther, 1985). Questa mobilità termina dopo 16-17 giorni dall'ovulazione con la fissazione, un processo in cui il miometrio aumenta di tonicità e fa in modo che l'embrione si fermi alla base di una delle due corna (Allen e Stewart, 2001).

### *1.1.3 Embriogenesi e sviluppo degli invogli*

Quando la morula arriva nell'utero, per assunzione di liquido uterino si sviluppa la blastocisti. Si tratta di una formazione vescicolare, che presenta internamente uno spazio cavo centrale (cavità di segmentazione o blastocele) ed è costituita da uno strato cellulare esterno (trofoblasto) e da una massa cellulare interna (nodo embrionale) (Barone, 1994). Dal nodo embrionale, per delaminazione si differenziano l'endoderma, un monostrato cellulare all'interno del trofoblasto, e l'ectoderma che rappresenta la massa di cellule indifferenziate del nodo embrionale. Tra ectoderma e endoderma si differenzia il mesoderma, che mediante la somatopleura, sua emanazione, va ad accollarsi al trofoblasto formando il corion. Per l'affondarsi dell'embrioblasto nella cavità del trofoblasto, i margini di questo si innalzano ad arco fino a chiudersi sopra l'area embrionale. Origina così l'amnios, il cui rivestimento interno è rappresentato dall'epitelio trofoblastico. Nel cavallo si forma a 13-16 giorni dal concepimento (Richter e Götze, 1986).

L'embrione prima dell'impianto si nutre dell'istiotrofo o "latte uterino", secreto dalle ghiandole dell'endometrio sotto stimolo del progesterone, che ne permette un rapido accrescimento in particolare a

carico della capsula alla quale aderiscono le proteine che costituiscono il secreto (Allen, 2001). Questo involucro è costituito da proteine mucino-simili e acido sialico, che con la sua carica negativa facilita il movimento dell'embrione nell'utero (Flood, 2003). La capsula ha inoltre la funzione di costituire una barriera che impedisce il contatto delle cellule materne con l'embrione e favorisce il trasferimento di nutrienti al conceptus (Kenney, 2003).

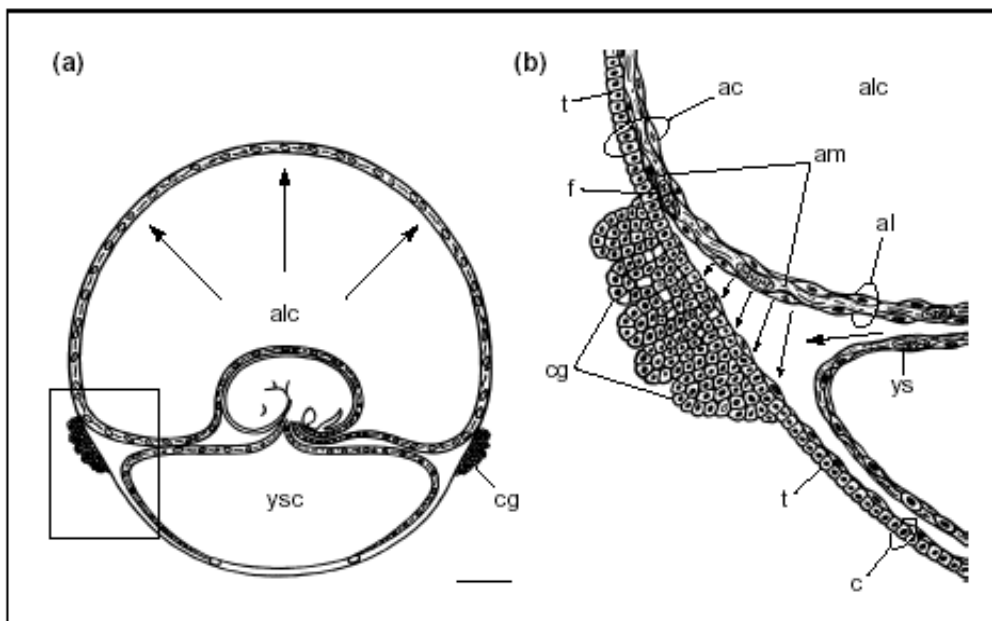
Intorno al 21° giorno dopo l'ovulazione, questa capsula inizia ad essere degradata da enzimi proteolitici secreti sia dal trofoblasto che dall'endometrio (Allen, 2001). Amoroso (1952) evidenziò che le cellule del trofoblasto si moltiplicano e vanno a protrudere nelle ghiandole endometriali assicurando così nutrimento e adesione dell'embrione all'endometrio. L'embrione diventa visibile ad un polo della vescicola dal 20° giorno e si possono distinguere il cuore primitivo, che pompa già sangue verso l'arteria vitellina, e una miriade di piccoli vasi che si sviluppano nel mesoderma (Allen e Stewart, 2001). L'allantoide è, in questa fase dello sviluppo, una protuberanza dell'intestino posteriore che in seguito cresce rapidamente fino a sovrastare l'embrione e a fondersi con il corion, formando così l'allantocorion (Allen, 2001).

Dall'amnios e dal foglietto allantoideo origina invece l'allantoamnios. Il corion riceve a questo punto la vascolarizzazione dall'allantoide, e diventa allantocorion. Entrambe queste membrane avvolgono i vasi ombelicali, che successivamente si allungano, contribuendo a formare il cordone ombelicale che collega gli involucri fetali al feto (Richter e Götze, 1986).



#### 1.1.4. Reazione delle coppe endometriali

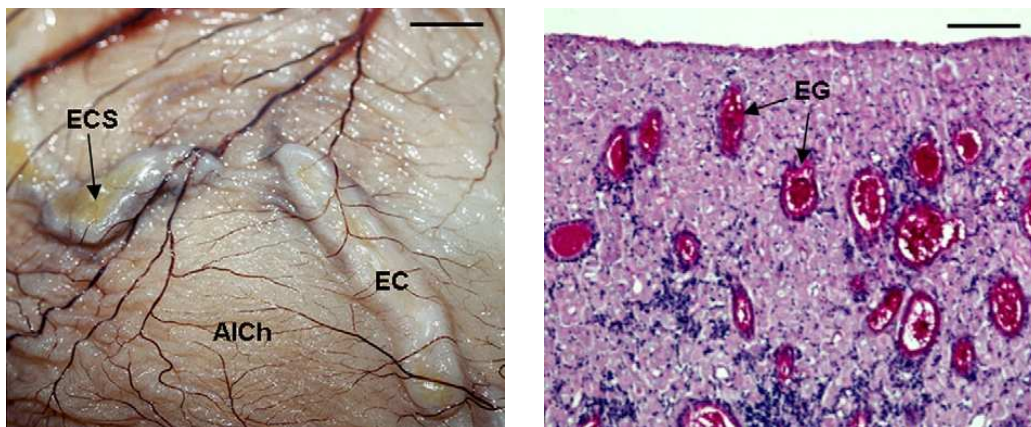
Tra il 25° ed il 35° giorno dopo l'ovulazione, sulla superficie del corion compare un sottile ispessimento a forma di anello. Questa cintura va a formare una serie di profonde ondulazioni nel corion, che sono dovute all'iperplasia delle cellule del trofoblasto. Le pieghe si approfondano e divengono delle estese creste (Figura 1).



**Figura 1.** Coppe endometriali (da Allen, 2001).

Dal 36° giorno, la cresta si stacca dalle membrane fetali e le cellule specializzate si dirigono verso la membrana basale dell'endometrio, da qui alle ghiandole endometriali e, rimuovendone le cellule epiteliali, raggiungono lo stroma dell'endometrio. Viene così a crearsi una serie di placche rilevate che si dispongono in circolo attorno all'embrione. Queste strutture sono denominate "coppe endometriali" e si presentano circolari, di 2 mm di diametro e 3-5 mm di profondità. Hanno una crescita progressiva, raggiungendo la dimensione massima a circa 70 giorni di gestazione, quando il loro aspetto diviene anche

caratterizzato dall'iperplasia dei margini e da una degenerazione centrale che conferisce loro un aspetto pallido. Istologicamente le coppe endometriali sono formate da una massa di cellule epitelioidei binucleate fittamente stipate, ed intercalate ai vasi ed alla porzione dilatata del fondo delle ghiandole endometriali. Alla periferia della coppa sono presenti larghi spazi in cui confluiscono plasmacellule, linfociti, macrofagi e eosinofili, che saranno determinanti nella distruzione della coppa stessa. Questa struttura deve infatti degenerare perché si possa successivamente formare l'unità feto placentare (Allen, 2001).



**Figura 2.** Aspetto macroscopico e microscopico delle coppe endometriali (EC) (Wilsher e Allen, 2009).

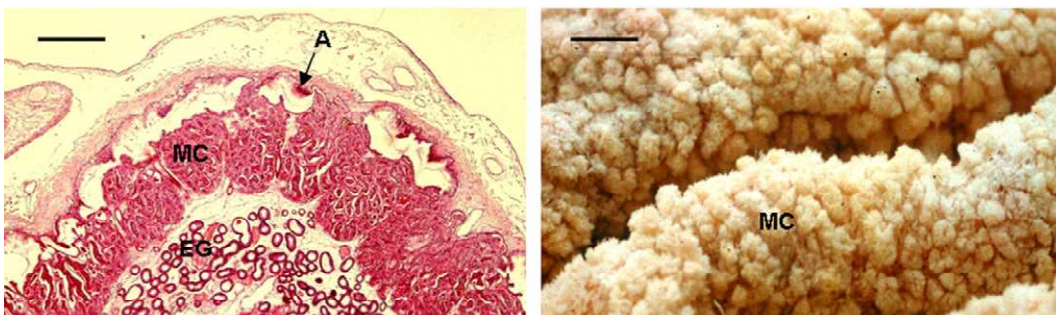
Verso il 70° giorno di gestazione, si assiste ad un aumento imponente dei linfociti che vanno a formare una vera barriera, che separa i tessuti fetali da quelli materni, per poi attaccare direttamente le coppe endometriali e accelerarne la morte (Allen e Steward, 2001).

Queste strutture hanno un importante ruolo ormonale: le cellule che le compongono secernono infatti glicoproteine ad alto peso molecolare, tra cui l'eCG (gonadotropina corionica equina).

Questo ormone ha un'azione LH-simile che favorisce la luteinizzazione, con o senza ovulazione dei follicoli dominanti formati in seguito alle ondate di crescita follicolare. Queste persistono infatti nella prima metà della gravidanza in conseguenza di un rilascio ciclico di FSH da parte dell'ipofisi. In questo modo vengono a formarsi una serie di corpi lutei accessori che persistono fino a metà gestazione, fino a quando cioè la placenta non è in grado di mantenere una concentrazione di progesterone sufficiente a portare a termine la gravidanza. L'eCG induce inoltre un aumento della concentrazione di estrogeni, in particolare verso il 70° giorno, quando inizia anche la produzione fetoplacentare (Allen, 2001).

#### *1.1.5. Placentazione*

Verso il 45° giorno di gravidanza, le cellule del trofoblasto cominciano a stabilire una reale connessione con l'endometrio. Sull'allantocorion compaiono i microvilli che si inseriscono poi nelle corrispondenti cripte endometriali (Richter e Götze, 1986).

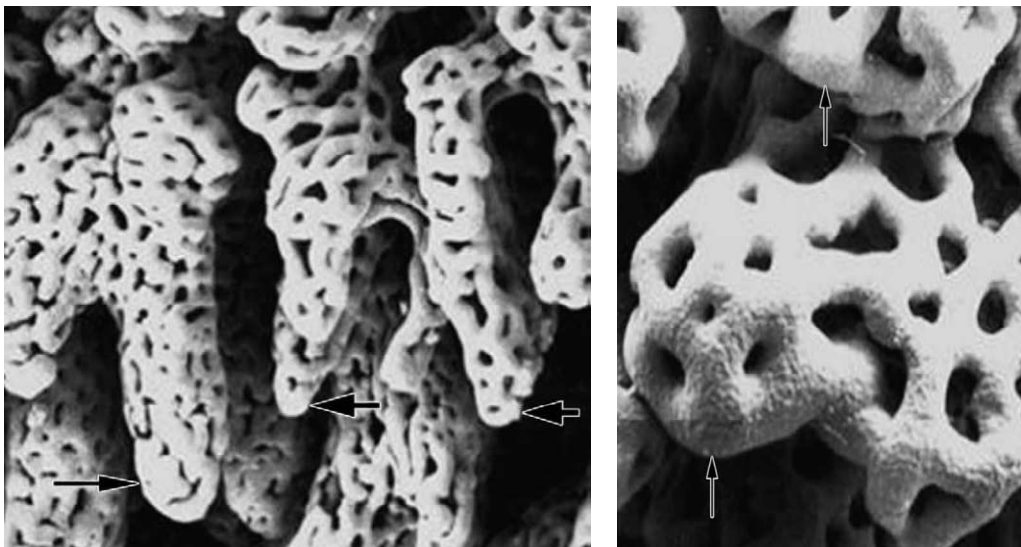


**Figura 3.** Aspetto dei microcotiledoni (Wilsher e Allen, 2009).

I microvilli sono delle strutture vascolari mesenchimali avvolte da cellule trofoblastiche e da cellule binucleate giganti. I microvilli

corionici si interdigitano con le pliche riccamente vascolarizzate della superficie endometriale. La loro funzione consiste nell'avvicinare i vasi fetali a quelli materni (Hafez, 1993).

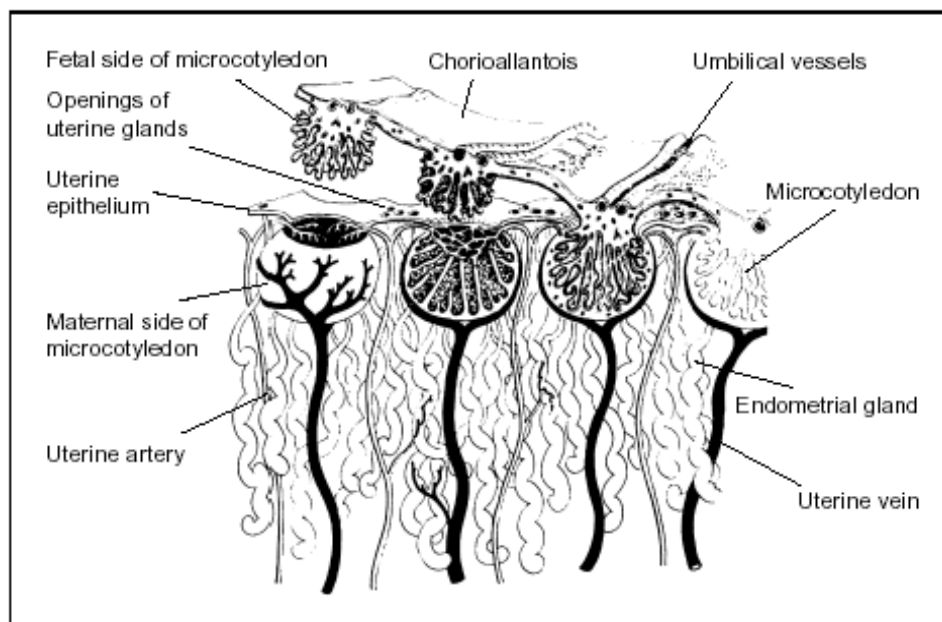
La superficie corionica della placenta è coperta su quasi tutta la sua estensione da un tappeto di piccoli rilievi rossi o brunastri debolmente ingranati nelle cripte della mucosa uterina, detti microcotiledoni (Barone, 1994) che si formano fra il 75° ed il 100° giorno dalla fecondazione (Hafez, 1993).



**Figura 4.** Arborizzazioni terminali dei microcotiledoni visti al microscopio elettronico a scansione (Abd-Elinnaeim et al., 2003).

I villi si ramificano da entrambi i versanti, materno e fetale, poi al 120° giorno di gestazione si costituisce il microcotiledone, la prima unità di scambio emotrofica placentare. Il microcotiledone ha una forma rotondeggiante e va ad incastrarsi nella microcaruncola costituendo il microplacentoma che ha un diametro di 240-260  $\mu\text{m}$  (Figura 3). Ogni microcotiledone è formato da 4-5 villi terminali,

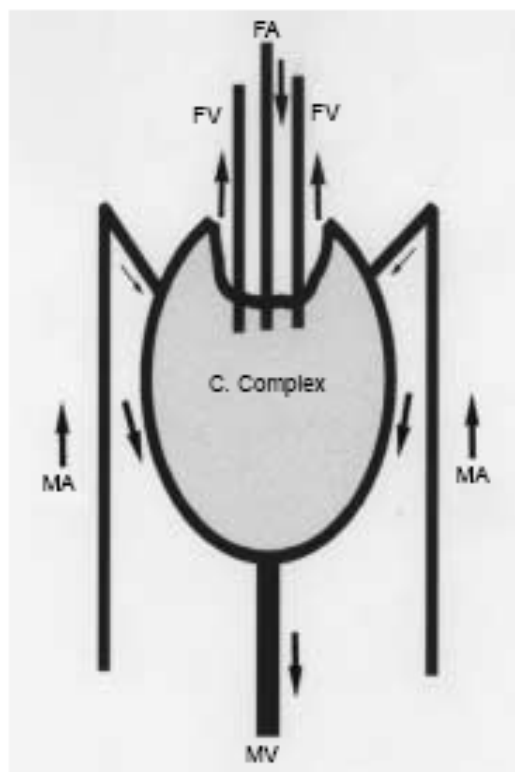
ognuno dei quali si divide in 6-8 villi intermedi, ciascuno dei quali da origine a 4-5 villi terminali (Abd-Elnaeim et al., 2003).



**Figura 5.** Irrorazione del microcotiledone (da Allen, 2001).

Ogni microcotiledone è irrorato da un'arteria di medio-grande calibro da parte materna e da una di grandezza equivalente da parte fetale (Steven e Samuel, 1975). L'arteria microcotiledonare materna, dopo aver percorso un breve e tortuoso percorso si divide in 4-5 arterie terminali, che ramificandosi ulteriormente danno origine ad una rete capillare da cui originano delle venule che confluiscono in un'unica vena drenante. Dal versante fetale ogni microcotiledone è irrorato da un'arteria centrale e drenato da due vene situate ai lati di quest'ultima (Figura 6) (Abd-Elnaeim et al., 2003). In nessuna fase della gravidanza si stabilisce comunicazione diretta tra vasi materni e vasi fetali (Richter e Götze, 1986). In condizioni fisiologiche il sangue

materno e quello dell'embrione non si mescolano; esiste infatti una separazione costituita dalla barriera placentare.



**Figura 6.** Rappresentazione schematica del microplacentoma. FA = arteria microcotiledonare fetale; FV = vena microcotiledonare fetale; MA = arteria materna microcaruncolare; MV = vena materna microcaruncolare; C complex = rete capillare. Le frecce mostrano la direzione del flusso sanguigno nei vasi fetali e materni (da Abd-Elnaeim et al., 2003).

In seguito all'instaurarsi della placentazione, le ghiandole uterine continuano ancora a secernere il loro prodotto e si creano delle zone dette areole in cui si concentra il secreto proteico che costituisce una sorta di nutrizione istiotrofica indispensabile a soddisfare le richieste per la crescita del feto (Allen, 2001). Lo sviluppo della placenta è completo a 150 giorni di gestazione (Asbury e LeBlanc, 1993).

## 1.2. MORFOLOGIA DELLA PLACENTA

### *1.2.1 Forma e peso*

La placenta equina è definita di tipo *epitelio-coriale diffusa*, dal momento che i villi ricoprono totalmente la superficie in rapporto con l'endometrio, e *adecidua* perché al momento del distacco dall'utero non si ha perdita di sangue materno. Alla fine della gravidanza la placenta rispecchia la conformazione dell'utero materno (Cottril, 1991), ed il suo peso, dopo il secondamento, dovrebbe normalmente corrispondere a circa il 10-12% del peso del puledro alla nascita (Vaala, 2002).

Gli annessi embrionali derivano dalle parti della blastocisti che non appartengono all'embrione. Tra essi, due costituiscono dei veri e propri involucri: il più esterno è il corion; l'altro che racchiude l'embrione e poi il feto, è l'amnios. Altri due annessi, il sacco vitellino e l'allantoide, sono di origine endoblastica e costituiscono ciascuno una vescicola il cui volume e conformazione variano molto a seconda del periodo e della specie. Il cordone ombelicale li unisce all'embrione (Barone, 1994).

### *1.2.2. Sacco Vitellino*

Deriva dalla cavità della blastocisti e risulta delimitato dal foglietto viscerale del mesoderma. E' la membrana fetale più piccola per dimensioni riducendosi durante lo sviluppo embrionale (Aguggini et al., 1998). E' un annesso embrionale transitorio, che ha il compito di assicurare con la sua rete sanguigna i primi scambi tra l'embrione e l'ambiente uterino. La rete vascolare vitellina, che occupa lo strato periferico del mesoblasto extraembrionale, è molto ricca prima che si

formi la circolazione allantoidea, per poi regredire a partire dal quarto mese e l'insieme si riduce ad un tratto vestigiale in seno al cordone ombelicale fino agli ultimi mesi di gravidanza (Barone, 1994). Dalla fusione del sacco vitellino con il corion deriva l'onfaloplacenta (Aguggini et al., 1998), una placenta primitiva detta anche placenta corio-vitellina. Essa regredisce entro il terzo mese di gestazione (Veggetti, 1987), ed è rapidamente sostituita da una allanto-placenta o placenta corio-allantoidea, irrorata dai vasi ombelicali e che persiste fino alla nascita (Barone, 1994).

### *1.2.3. Allantocorion*

L'allantocorion è costituito da due versanti distinti, uno corionico che prende attacco sull'endometrio e uno che invece riveste l'omonima cavità allantoidea. Il corion è caratterizzato dalla presenza di villi che entrano nelle cripte uterine, mentre la superficie allantoidea si presenta liscia, lucida e solcata da una ricca rete di vasi (Richter e Götze, 1986). I villi coriali sono formati da uno stroma mesenchimale riccamente vascolarizzato da vasi di derivazione allantoidea. La superficie del villo è ricoperta da epitelio isoprismatico semplice (Veggetti, 1987).

Il corion è un sacco membranoso che costituisce l'invoglio più esterno del conceptus, modellato secondo la forma dell'utero. Nella placenta diffusa degli equidi, tutta la superficie coriale presenta un aspetto vellutato e mostra ovunque dei piccoli ciuffi di microvilli.

L'ultrastruttura dell'unità utero-placentare è inoltre molto simile a quella del polmone. Infatti la barriera alveolare dei mammiferi risulta costituita da capillari non fenestrati, da uno strato formato dalla fusione della membrana basale di questi con l'epitelio e da un epitelio che nel polmone è in contatto con l'aria, mentre nella placenta equina



è in apposizione con l'epitelio uterino. In modo particolare, la somiglianza tra i due tessuti è evidente nello strato subepiteliale formato dall'endotelio e dalla membrana basale, strato che in entrambi risulta essere notevolmente sottile. L'epitelio del corion invece, pur assottigliandosi molto nel corso della gravidanza e soprattutto negli ultimi due mesi di gestazione, rimane comunque superiore ai 2,4-3  $\mu\text{m}$  di spessore, di molto maggiore rispetto a quello alveolare (Steven e Samuel, 1975).

#### *1.2.4. Allantoamnios*

L'amniogenesi nella specie equina si sviluppa dall'unione delle due pieghe amniotiche formate dall'ectoderma e dal foglietto parietale del mesoderma. La faccia esterna è completamente rivestita dall'allantoide, che lo separa dal corion. E' percorsa da alcuni grossi vasi flessuosi, rivestiti da una spessa guaina connettivale biancastra. La sua faccia interna, liscia, presenta delle piccole papille glicogeniche che son più numerose in prossimità dell'ilo, dove la rendono rugosa (Barone, 1994). L'allantoamnios è la seconda membrana che compone l'insieme degli involucri fetali, e deriva dalla fusione dell'amnios, tessuto ectodermico, con l'allantoide, di origine endodermica, mediante l'interposizione di tessuto connettivo (Asbury e LeBlanc, 1993). Si presenta come una membrana traslucida solcata da una ricca rete di vasi, con uno spessore notevolmente ridotto rispetto all'allantocorion. Inoltre esso si adatta meno alla forma dell'utero, poiché riveste direttamente il feto delimitando la cavità amniotica (Richter e Götze, 1986). La sua parete sottile e trasparente, ma resistente, delimita la cavità amniotica, contenente il liquido amniotico nel quale è sospeso l'embrione (Barone, 1994).

### *1.2.6 Cordone ombelicale*

Il cordone ombelicale rappresenta la reale connessione del feto con l'organo placentale (Schlafer, 2003). La sua lunghezza varia da 50 a 100 cm (Asbury e LeBlanc, 1993), ed è sempre possibile distinguere in esso una porzione amniotica ed una allantoidea. In esso scorrono una vena, due arterie, e solo nella porzione amniotica, l'uraco, che collega la vescica del feto alla cavità allantoidea. Il tutto è sostenuto da tessuto connettivo chiamato gelatina di Warthon. Nella porzione allantoidea in realtà le vene sono due, e si uniscono proprio prossimalmente all'inserzione dell'amnios sul cordone (Schlafer, 2003). All'interno del cordone ombelicale o nel celoma extraembrionale, può essere rinvenuto anche il residuo del sacco vitellino (Whitwell e Jeffcott, 1975). Normalmente il cordone ombelicale appare spiralato a causa dei movimenti fetali (Schlafer, 2003).

## 1.3. LIQUIDI FETALI

### *1.3.1 Liquido allantoideo*

È il fluido fetale più abbondante, oscillando tra gli 8 e i 15 litri. È costituito da urine ipotoniche e da altri prodotti di escrezione del feto (Asbury e LeBlanc, 1993). Il suo colore è giallo-marrone, torbido (Whitwell e Jeffcott, 1975), e la sua funzione è quella di mantenere la pressione osmotica del plasma del feto, impedendo la perdita di fluidi nella circolazione materna. Nel liquido allantoideo è presente un corpo galleggiante o peduncolato di forma discoidale chiamato ippomane. Le sue dimensioni sono di circa 15 cm e il suo peso è di circa 200 grammi (Asbury e LeBlanc, 1993). L'ippomane deriva da residui di

latte uterino non utilizzati, che si addensano formando strati concentrici (Richter e Götze ,1986).

### *1.3.2 Liquido amniotico*

Il liquido amniotico, leggermente alcalino, contiene in esso svariate sostanze (acido lattico, glucosio, urea, acido urico e materiale in sospensione come cellule desquamate, ferro, enzimi, ecc), che si forma per accumulo di urina fetale, di secrezione delle ghiandole salivari e delle vie aeree e per interscambio di acqua tra la circolazione materna e quella fetale. E' continuamente rinnovato in poche ore per l'attività delle cellule dell'epitelio amniotico; in parte deglutito dal feto e quindi riassorbito, in parte giunge fino alla mucosa uterina passando attraverso le varie membrane che avvolgono il feto (Veggetti, 1987). E' inizialmente chiaro e trasparente, ma verso fine gravidanza diventa citrino, viscoso e più o meno torbido (Barone, 1994). Inoltre col progredire della gravidanza aumenta la concentrazione delle secrezioni respiratorie; questo fa sì che la consistenza del liquido stesso cambi diventando mucoide (Asbury e LeBlanc, 1993).

A fine gestazione il volume di liquido amniotico oscilla tra i 3 e i 5 litri ed è quindi nettamente inferiore al volume di liquido allantoideo, ma durante la gravidanza si hanno delle oscillazioni nel rapporto tra i due fluidi. All'interno del liquido amniotico sono spesso presenti peli e pezzetti di podofilla disgregatasi dallo zoccolo non ancora corneificato (Whitwell e Jeffcott, 1975). Il liquido amniotico rappresenta una sorta di mezzo per gli scambi di acqua tra la madre e il feto, che è anche in grado di richiamare acqua deglutendo o

introducendo nei polmoni il liquido mediante i movimenti respiratori (Asbury e LeBlanc, 1993).

La funzione principale del liquido amniotico è quella di mantenere idratato l'embrione e di proteggerlo dagli shock termici, traumatici e compressivi (Aguggini et al.,1998).

#### 1.4. FUNZIONI ENDOCRINE DELLA PLACENTA

La placenta è un organo endocrino transitorio come il corpo luteo (Asbury e LeBlanc, 1993), secerne sia ormoni ad attività trofica che ormoni steroidei che vengono liberati sia nel sangue materno che fetale attraverso il sangue venoso ombelicale (Richter e Götze, 1986). La produzione ormonale inizia già prima della costituzione dell'unità feto-placentare con la formazione delle coppe endometriali che producono eCG, con concentrazioni che rimangono elevate nella specie equina dal 50° al 145° giorno di gestazione (Veggetti, 1987). Il progesterone ( $P_4$ ) è necessario per il mantenimento della gravidanza nella cavalla, e fino all'80° giorno di gestazione, il corpo luteo è la fonte primaria di progesterone; a questo punto, l'unità fetoplacentare comincia a contribuire producendo 5- $\alpha$  pregnani, per cui si assiste ad una diminuzione della concentrazione di progesterone misurabile nel sangue della fattrice. Dopo il 120° giorno la concentrazione oscilla da 1 a 8 ng/ml a seconda della sensibilità della metodica RIA utilizzata, non essendo rilevati con questa metodica i progestageni placentari (Asbury e LeBlanc,1993). Nelle ultime quattro-sei settimane, il progesterone subisce un nuovo rialzo per poi calare rapidamente nell'immediato periodo precedente al parto (Allen, 2003).

Grazie ad una perfetta integrazione delle funzioni steroidogeniche fetali e placentari, l'unità feto-placentare è in grado di elaborare la maggior parte degli steroidi ad attività ormonale. La fattrice è in grado di sintetizzare quantità di progesterone sufficienti a mantenere la gravidanza utilizzando l'acetato ed il colesterolo presenti nel sangue materno. Nel corso della seconda metà della gravidanza, sintetizza notevoli quantità di estrogeni a partire da precursori di origine fetale; ciò non è necessario per la sintesi del progesterone (Hafez,1993). L'aumento di progestageni nell'ultima parte della gravidanza è associato allo sviluppo della ghiandola mammaria e delle secrezioni mammarie, mentre il declino è concomitante all'aumento del cortisolo fetale (Allen, 2003).

Attualmente il ruolo biologico dei progestageni nella fattrice non è ben chiaro e quando testati in vitro tutti i progestageni non sono riusciti a contrastare le contrazioni del miometrio indotte dall'ossitocina; sembra quindi possibile che altri ormoni svolgano un ruolo nella quiescenza del miometrio (Allen, 2003).

La relaxina è prodotta principalmente dalla placenta, in particolare dalle cellule del trofoblasto. La concentrazione nella fattrice aumenta a partire dagli 80 giorni di gestazione, quando la placenta inizia ad aumentare di volume, e tende a rimanere alta anche successivamente. Un ulteriore aumento si verifica al momento del parto, che viene probabilmente avviato dall'ossitocina (OX).

Stewart et al. (1984) hanno dimostrato che la concentrazione di relaxina aumenta dopo la somministrazione di OX esogena nella fattrice a termine. Nel post-partum la concentrazione diminuisce gradualmente dal momento dell'espulsione della placenta ma può restare elevata in casi di ritenzione placentare. Come dice il nome, la

relaxina sembra essere responsabile della quiescenza del miometrio, ma paradossalmente la sua concentrazione aumenta sostanzialmente proprio al momento del parto attivo.

L'ipotesi è che questi alti livelli servano a rendere quiescente il miometrio per un breve periodo (2-4 ore) prima del parto. Gli stessi autori hanno proposto che gli elevati livelli di prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) durante il parto sono necessari per sovrastare l'effetto della relaxina (Haluska et al., 1987; Allen, 2003).

I tessuti uteroplacentari sintetizzano durante la gravidanza la  $PGF_{2\alpha}$  e la  $PGE_2$ , i cui livelli materni restano bassi durante la seconda metà della gravidanza (1-2 ng/ml) ed aumentano leggermente quando la gravidanza arriva al termine. Questi bassi livelli sono mantenuti probabilmente dalla 15-idrossiprostaglandin deidrogenasi, presente nell'endometrio, che inattiva rapidamente le prostaglandine. Durante la prima fase del parto, c'è un iniziale aumento dei metaboliti della  $PGF_{2\alpha}$  ( $PGFM$ ) (>20 ng/ml), seguito da un ulteriore aumento (>100 ng/ml) durante la fase espulsiva. L'aumento iniziale della  $PGF_{2\alpha}$  precede la rottura dell'allantocorion e la secrezione di OX dall'ipofisi (Allen, 2003).

La placenta sintetizza anche estrogeni in quantità piuttosto elevata sempre a partire dall'80° giorno, prima del quale essi risultano di pertinenza ovarica (Allen, 2001).

Il ruolo degli estrogeni nella placenta equina è stato studiato meno rispetto a quello dei progestageni. Non sono essenziali nel mantenimento della gravidanza a fine gestazione, ma risultano fondamentali per il parto (Allen, 2003).

La fattrice differisce dalle altre specie proprio riguardo la produzione di estrogeni poiché la loro produzione diminuisce piuttosto che

aumentare prima del parto e perché produce grandi quantità di estrogeni insaturi, l'equilina e l'equilenina, nella seconda metà della gravidanza.

Gli estrogeni sono presenti nel plasma materno, nell'urina e nel liquido allantoideo e includono l'estrone, l'estradiolo-17 $\alpha$ , e  $\beta$ , l'equilina e l'equilenina; sono presenti inoltre idrossiderivati e solfoconiugati come ad esempio la 17 $\beta$ -idrossiequilenina e l'estrone solfato. Il principale precursore degli estrogeni è il diidroepiandrosterone (DHA), prodotto in grande quantità dalle voluminose gonadi fetali e riversato nell'arteria ombelicale.

La loro concentrazione nel sangue materno aumenta al 100° giorno e rimane alta fino agli ultimi 2-3 mesi di gravidanza, quando gradualmente declina. Ciò riflette prima l'ipertrofia poi la regressione delle gonadi fetali (Allen, 2003).

L'importanza degli estrogeni nel parto è stata dimostrata nel 1979 da Pashen e Allen. Le fattrici con feti gonadectomizzati mostravano delle deboli contrazioni miometriali e una più bassa concentrazione di metaboliti delle PGF2 $\alpha$ , durante il parto.

## **CAPITOLO 2: SCAMBI PLACENTARI E NUTRIZIONE DEL FETO**

Le esigenze di un organismo in crescita come il feto dei mammiferi includono sia substrati energetici che sostanze strutturali per la produzione del nuovo tessuto. Il feto si trova in uno “stato stazionario”, in cui le concentrazioni di soluti nel sangue e in altri fluidi corporei sono ragionevolmente costanti, nonostante l'organismo nel suo insieme stia crescendo ed aumentando le proprie riserve corporee totali. In tale stato stazionario, i substrati assunti dal feto attraverso la circolazione ombelicale non si accumulano nel fluido extracellulare, ma entrano nei tessuti, dove vengono utilizzati in diversi modi. Di conseguenza l'assorbimento e l'utilizzo dei substrati da parte del feto sono in equilibrio (Battaglia e Meschia, 1978).

### **2.1. DIREZIONE DEL FLUSSO SANGUIGNO NEL MICROCOTILEDONE**

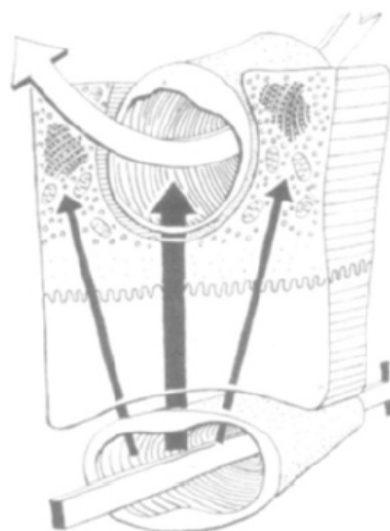
La circolazione placentare risulta sostenuta da una circolazione materna (utero-placentare) e da una circolazione fetale per mezzo di arterie e vene ombelicali (Aguggini, 1998).

I microcotiledoni della cavalla sono riccamente vascolarizzati; arterie lunghe e dritte passano dalle ghiandole uterine all'endometrio, dove si ramificano. Ogni ramo, appena penetrato nel microcotiledone, dà luogo ad una fitta rete vascolare nella parete delle cripte materne.

Questa rete di capillari confluisce in un'unica vena che attraversa il complesso subendometriale. Sul versante fetale i villi corionici sono vascolarizzati da rami delle arterie e vene ombelicali. La velocità del



flusso sanguigno è un fattore molto importante per l'efficienza degli scambi placentari, ed è determinata dalla direzione dello stesso nel versante materno ed in quello fetale. La placenta equina è caratterizzata dall'aver due flussi che scorrono in direzione opposta e si incrociano, costituendo il sistema “*controcorrente*”, nel quale il flusso nei capillari fetali va dall'apice alla base del villo con direzione opposta rispetto al sangue materno.



**Figura 7.** Disegno schematico del flusso controcorrente tra comparto materno (inferiore) e placentare (superiore) (Allen et al., 2002).

Il flusso ematico ombelicale nel feto di cavalla è ridotto rispetto alle altre specie, anche se il flusso di sangue della barriera placentare non è sempre uguale nel corso di tutta la gravidanza. Nei primi mesi dopo la formazione della placenta i due flussi scorrono infatti in serie e lo spessore della barriera risulta essere molto ampio, per cui i metaboliti sono costretti a passare attraverso i tessuti placentari. A fine gravidanza i flussi assumono invece una direzione più parallela e lo

spessore dell'epitelio materno e del trofoblasto stesso diminuiscono, determinando una maggiore efficienza degli scambi, per soddisfare le maggiori necessità del feto (Samuel et al., 1976).

## 2.2. METABOLISMO OSSIDATIVO

Nella placenta equina sono presenti molte aree specializzate nello scambio dei gas (Silver, 1984). La placenta è il vero e proprio organo respiratorio del feto, ed il passaggio di ossigeno ed anidride carbonica è favorito da un gradiente pressorio esistente tra i due versanti del circolo (Richter e Götze, 1986). Il passaggio avviene quindi per semplice diffusione, nel modo meno dispendioso per i tessuti dal punto di vista energetico. L'affinità del sangue fetale per l'O<sub>2</sub> è maggiore rispetto a quella del sangue materno e questa differenza favorisce il trasferimento dell'O<sub>2</sub> dalla madre al feto, il quale normalmente è esposto a basse tensioni arteriose di O<sub>2</sub> e può sfruttare questa maggiore affinità per saturare completamente la propria emoglobina (Reece, 2002). Tra il circolo materno e quello fetale esiste solo una piccola differenza pressoria (4 mmHg), ma una pO<sub>2</sub> decisamente maggiore nel circolo fetale rispetto alle altre specie domestiche (Silver, 1984). Le differenze nella pO<sub>2</sub> e nella pCO<sub>2</sub> tra le arterie uterine e le arterie ombelicali sono inferiori nella cavalla rispetto alla pecora (Comline e Silver, 1970). Per ogni dato valore di PO<sub>2</sub> materna compresa tra 30 e 100 mmHg, si ha un aumento lineare dei valori della PO<sub>2</sub> fetale, anche se nel cavallo il valore fetale è molto più simile a quello materno rispetto alla pecora. Nel feto ovino la pO<sub>2</sub> raggiunge un valore di concentrazione massima quando la pO<sub>2</sub> materna supera i 100 mmHg, mentre nel cavallo i valori fetali continuano ad

avere una crescita lineare anche oltre questo limite (Comline e Silver, 1970). Complessivamente nella specie equina l'assunzione di ossigeno è molto alta; se confrontata per esempio con la pecora, a metà gestazione la quantità di ossigeno assunta dall'unità fetoplacentare equina è più del doppio di quella assunta dai tessuti del ruminante, e rimane nettamente maggiore fino al termine della gravidanza. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato se si considera che i tessuti placentari della cavalla continuano a crescere nel corso di tutta la gravidanza, anche a livello di area microscopica di contatto materno-fetale (Fowden et al., 2003a), mentre nella pecora dopo aver raggiunto il massimo sviluppo a circa metà gestazione, diminuiscono progressivamente di peso (Fowden et al., 2000b). In condizioni di normale pO<sub>2</sub> arteriosa materna, il cavallo ha un basso gradiente transplacentare della pO<sub>2</sub> rispetto alla pecora, e di conseguenza una forza più piccola per il movimento di O<sub>2</sub> dalla fattrice al feto, tuttavia il feto equino riesce ad ovviare a questa differenza con un tasso di estrazione migliore. Questo probabilmente è da attribuire al funzionamento più efficiente del sistema vascolare controcorrente del cavallo (Comline e Silver, 1970).

## 2.3. CARBOIDRATI

### 2.3.1. *Glucosio*

Il glucosio è uno dei principali nutrienti del feto equino. Le concentrazioni di glucosio misurate nel sangue fetale e in quello materno (3,3 e 6 mmol/L rispettivamente) sono decisamente elevate in rapporto a quelle della pecora (1 e 3 mmol/L rispettivamente) e di altri ruminanti (Silver, 1984); il gradiente di concentrazione transplacentare è decisamente più basso nei ruminanti rispetto agli

erbivori non ruminanti (Fowden et al., 2003a). Anche i tessuti materni necessitano di glucosio; Fowden e Silver (1995) hanno evidenziato nel cavallo un flusso di glucosio dal feto al tessuto uteroplacentare, suggerendo che l'utero derivi il proprio nutrimento in parte anche dai tessuti fetali. Inoltre la quantità di glucosio che assume l'utero è maggiore rispetto a quanto avviene nella pecora ad un medesimo stadio gestazionale, confermando una maggiore permeabilità ed un maggiore consumo di glucosio dei tessuti uterini della cavalla. L'assorbimento del glucosio è facilitato dall'attività di specifiche proteine trasportatrici; questo tipo di trasporto non richiede consumo di energia, ma un elevato gradiente di concentrazione tra circolazione materna e fetale (Bell et al., 1999). Esistono dodici isoforme dei trasportatori del glucosio, ma nella placenta equina sono presenti solo il trasportatore 1 (GLUT1) ed il trasportatore 3 (GLUT3) (Wooding, 2003). Sono dei trasportatori del glucosio non-insulino sensibili e sono i due carriers maggiormente distribuiti nei tessuti. Nella placenta equina sono localizzati a livelli diversi dell'epitelio placentare. Il GLUT1 è localizzato principalmente sulla superficie basolaterale del trofoblasto e sull'epitelio uterino, mentre a livello dell'apice del villo è presente solo il GLUT3 (Wooding, 2003). Il GLUT3 è tra i due il più efficiente, riuscendo a funzionare anche a basse concentrazioni di glucosio, e risulta quindi il più utilizzato (Wooding, 2003).

### 2.3.2. *Lattato*

Il lattato è il prodotto finale sia del metabolismo aerobico che anaerobico del glucosio, e viene prodotto invariabilmente in caso di ipossia e scarsa perfusione tissutale (Lagutchik et al. 1996; De Bakere 2003). Studi condotti su diverse specie animali hanno rilevato una

concentrazione di lattato fetale superiore a quello materno durante tutta la gravidanza (Burd et al. 1975; Sparks et al. 1982; Pere 1995). Il lattato fetale non è solo un prodotto finale del metabolismo del glucosio, ma piuttosto un substrato metabolico particolarmente importante a fine gestazione, come dimostrato da studi condotti sugli animali e sull'uomo (Sparks et al. 1982; Piquard et al. 1990). Studi condotti in vitro sulla placenta umana e in vivo nella pecora e nella scrofa hanno dimostrato che la placenta metabolizza rapidamente il glucosio producendo grandi quantità di lattato come sottoprodotto; questo viene quindi immesso nella circolazione fetale dove gioca un ruolo importante come substrato metabolico (Burd et al., 1975; Holzman et al. 1979; Sparks et al. 1982; Carter et al., 1993; Pere 1995). Nella pecora il lattato, trasferito dalla placenta al feto attraverso la vena ombelicale, viene utilizzato come fonte di energia in una varietà di tessuti fetali (Burd et al. 1975, Gleason et al. 1985). Anche nella specie equina, la captazione del lattato proveniente dalla placenta sembra aumentare col proseguire della gestazione; tuttavia, rispetto al feto ovino, il feto equino sembra utilizzare preferibilmente glucosio e lipidi, piuttosto che il lattato (Fowden et al. 2000a; Fowden et al. 2000b). Trasportatori del lattato  $H^+$  dipendenti sono stati descritti sul sinciziotrofoblasto della placenta umana, sia sul versante materno che fetale (Carstensen et al. 1983; Balkovetz et al. 1988; Inuyama et al. 2002). Questo sistema potrebbe impedire l'accumulo di lattato nel compartimento fetale, quando il feto aumenta la propria produzione, come nei casi di riduzione del flusso sanguigno uterino e di ipossia fetale (Hooper et al. 1995; Nicolaidis et al. 2006). Inoltre, la ridotta attività di trasporto del lattato che è stata individuata nelle placenti in caso di ritardo di crescita intrauterino (IUGR), potrebbe contribuire ad

una iperlattatemia fetale ed influenzare la capacità del feto di tollerare lo stress del parto (Settle et al. 2006).

#### 2.4. AMMINOACIDI

Le concentrazioni plasmatiche di molti aminoacidi sono più elevate nel feto rispetto alla madre nella maggior parte dei mammiferi, suggerendo un trasporto attivo attraverso la placenta; diversi trasportatori specifici (alcuni Na-dipendenti) che richiedono energia metabolica sono stati individuati nelle membrane placentari (Battaglia e Regnault 2001; Jansson 2001). L'apporto energetico al fabbisogno fetale delle transaminazioni aminoacidiche nella placenta equina è inferiore rispetto alla pecora (Fowden et al., 2003a). L'urea, principale prodotto di degradazione degli aminoacidi, viene prodotta dal puledro in quantità simili a quelle prodotte dall'agnello, probabilmente a causa di una minore disponibilità all'ossidazione del carbonio aminoacidico nell'ultimo periodo di gestazione (Wooding e Fowden, 2006). L'assorbimento degli aminoacidi è inoltre strettamente legato alla velocità di accrescimento del feto e non viene mai assorbito in eccesso, come avviene invece nell'agnello, in cui è utilizzato come fonte di carbonio per il metabolismo ossidativo (Fowden et al., 2003a).

## 2.5. ACIDI GRASSI

Tutti feti dei mammiferi studiati finora hanno la capacità di sintetizzare lipidi, ma differiscono notevolmente per quanto riguarda la quantità e l'origine del grasso immagazzinato prima della nascita. I lipidi fetali possono originare o dal trasferimento placentare di acidi grassi e glicerolo o mediante sintesi de novo di acidi grassi essenziali e glicerolo nel feto (Battaglia e Meschia, 1978). Gli acidi grassi hanno un elevato contenuto di carbonio e per questo motivo anche una piccola assunzione di lipidi assume grande importanza per sopperire al bisogno fisiologico di substrati ossidativi (Wooding e Fowden, 2006).

### **CAPITOLO 3: PATOLOGIE DEGLI INVOGLI FETALI**

L'impatto dei disordini materni o placentari sull'ambiente intrauterino in genere provoca una compromissione fetale o neonatale, data dall'effetto singolo o combinato di tre meccanismi: ipossia, infezioni, e disturbi nello sviluppo intrauterino. La compromissione fetale può portare ad un parto prematuro o complicato, alla morte fetale, alla natimortalità, o ad anomalie nello sviluppo neonatale e sul comportamento del puledro. Gli effetti della compromissione fetale dipendono dalla natura, dalla durata, dalla gravità, e dalla fase di gestazione in cui si verifica la condizione stressante. I disturbi intrauterini, con la riduzione dello sviluppo normale della microstruttura dei tessuti, forniscono una possibile spiegazione per alcuni dei rilievi necroscopici in puledri prematuri o dismaturi (Ansari, 1998). Una crescita ed uno sviluppo normale della placenta sono condizioni necessarie affinché la crescita e lo sviluppo del feto siano altrettanto normali (Collins, 1993). Le alterazioni degli scambi materno-fetali possono influenzare gli interscambi gassosi, quelli dei principi nutritivi e dei cataboliti, e modificare i processi metabolici ed endocrini del feto (Fowden et al., 1998).

#### **3.1. IPOPLASIA DEI VILLI CORIALI**

Le alterazioni degenerative a carico dell'endometrio dovute all'età possono limitare la placentazione riducendo l'area di scambio materno-fetale. Con il termine generico di endometriosi vengono solitamente indicate una serie di alterazioni diverse, tutte legate al progredire dell'età della fattrice. Tra queste sono importanti la fibrosi e l'atonia del miometrio, che provocano stasi linfatica, accumulo



stromale di cellule infiammatorie, degenerazione, occlusione dei vasi endometriali e degenerazione delle ghiandole endometriali (Allen, 2003). In particolare quest'ultima produce un ritardo nello sviluppo dei microcotiledoni e ne riduce l'area di estensione sulla superficie placentare. Tuttavia le cisti endometriali non sempre hanno un'influenza negativa sulla placentazione; se tra le cisti e la superficie endometriale rimane un discreto strato di ghiandole endometriali funzionanti, i microcotiledoni si sviluppano normalmente, mentre se le cisti sono superficiali e molto estese si riduce l'area di scambio placentare, ed anche all'esame macroscopico degli involucri sarà possibile evidenziare aree prive di villi. L'endometriosi quindi, a seconda del grado di interessamento dell'utero, può provocare un ritardo di crescita intrauterino nel feto o anche l'aborto (Bracher et al., 1996).

### 3.2. PLACENTITE

La placentite rappresenta la più frequente patologia delle membrane fetali (Williams et al., 2003), ed è una causa importante di aborto tardivo, di parto prematuro e di mortalità neonatale. Può essere causata da una varietà di organismi batterici, fungini, virali e protozoari. È comunemente causata da batteri che risalgono attraverso la vagina, ma talvolta i batteri possono raggiungere l'utero anche per via ematogena (Hong et al., 1993; Vaala e Sertich, 1994). I patogeni batterici più frequentemente implicati nella placentite equina sono *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Leptospira* sp.. *Actinomyces* nocardiforme è stato segnalato in alcune aree degli Stati Uniti come causa di placentite. La via di infezione per questo organismo è ancora

poco conosciuta. *Aspergillus fumigatus* e altre specie delle Mucoracee sono le più comuni cause di aborto da miceti nel cavallo (Troedsson e Mcpherson, 2011). Anche se l'infezione batterica colpisce direttamente il feto causandone malattia, uno studio recente, basato su un modello sperimentale di placentite ascendente in fattrici pony, ha dimostrato che il parto prematuro può verificarsi secondariamente all'inflammatione del corion piuttosto che come conseguenza dell'infezione fetale (LeBlanc et al., 2002; Mays et al., 2002). L'infezione attiva i macrofagi placentari e ciò esita nella produzione di citochine proinfiammatorie: interleuchina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Le cellule del corion e della decidua producono anche metaboliti dell'acido arachidonico. Questi processi infiammatori provocano una produzione di prostaglandine (PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) e la stimolazione della contrattilità del miometrio (Macpherson, 2006), con conseguente parto prematuro. Tuttavia, in alcuni casi cronici di placentite, i puledri mostrano una accelerata maturazione. Questi puledri nasceranno comunque prima del termine, ma saranno abbastanza maturi per sopravvivere nell'ambiente extrauterino. In medicina umana, una maturazione precoce del feto sembra essere dovuta ad una diretta stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene del feto da parte delle citochine proinfiammatorie (Basedovsky e delRey, 1996; Gravett et al., 2002).

### 3.3. ANOMALIE DEL CORDONE OMBELICALE

Anche le anomalie a livello di cordone ombelicale possono tradursi in una sofferenza per il feto ed in un ritardo di crescita intrauterino. Nelle placenti di feti con cordone ombelicale eccessivamente lungo si osservano talvolta aree di atrofia (Schafner, 2003). Un cordone

ombelicale lungo più di 80 cm può causare, nei casi più gravi, aborto e morte fetale (Rossdale e Ousey, 2002). All'aumentare della lunghezza del cordone, aumenta anche il numero di spire che in esso si rilevano dopo il secondamento; si raggiunge il numero massimo di giri lungo il cordone circa a metà gestazione, poiché in seguito l'utero offre un impedimento spaziale tale da limitare i movimenti del feto (Oulton et al., 2003). Ovviamente la torsione del cordone diminuisce l'afflusso di sangue al puledro e quindi di ossigeno e nutrienti, con ripercussioni più o meno gravi. Se l'insulto è prolungato nel tempo, tale da divenire cronico, non si verifica generalmente la morte del feto, ma un arresto o una diminuzione dello sviluppo fetale, con un elevato rischio di danno neuronale (Rossdale e Ousey, 2002).

#### 3.4. CONSEGUENZE DELL'INSUFFICIENZA PLACENTARE

L'insufficienza placentare è un processo che, come già detto, porta al deterioramento progressivo della funzione placentare, con una diminuzione nel trasferimento transplacentare di ossigeno e sostanze nutritive al feto. L'ipossiemia fetale è lo stimolo principale coinvolto nella riduzione della crescita fetale, quasi un tentativo dell'organismo di ridurre le richieste metaboliche per la crescita del feto (Lackman et al., 2001).

Quando le richieste metaboliche aumentano, intervengono meccanismi fisiologici in grado di incrementare il trasporto e l'estrazione dell'ossigeno dal sangue. Se la distribuzione è ridotta, il consumo d'ossigeno è mantenuto costante dall'aumento della sua estrazione dal sangue ma, se anche tale meccanismo viene meno, il

consumo comincia a diminuire e l'energia necessaria alla cellula viene prodotta mediante il metabolismo anaerobio.

La carenza di ossigeno determina negli organismi eucarioti l'attivazione di una serie specifica di adattamenti cellulari (Baird et al., 2006). Molti di questi cambiamenti sono conseguenti all'attivazione dell'Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1), una complessa molecola eterodimerica composta da una subunità  $\alpha$  e una  $\beta$ . L'HIF-1 $\alpha$  regola numerosi geni coinvolti nel metabolismo, nella crescita, nella proliferazione e nella morte cellulare (Semenza, 1998; Maxwell, 2005; Baird et al, 2006). Allo stesso tempo in assenza/carenza di ossigeno viene altamente sovraespressa una seconda importante classe di proteine rappresentate dalle Heat Shock Proteins (HSP), la cui sintesi è legata ad un fattore dello stress noto come Heat Shock Factor (HSF1) (Baird et al, 2006). In medicina umana è evidenziabile un aumento della differenza di concentrazione del glucosio tra la circolazione fetale e materna, con conseguente aumento del gradiente transmembranoso e del trasporto a favore del feto affinché riceva una quantità di glucosio ancora sufficiente. Questo aumento è tanto maggiore quanto più compromessa è la funzionalità placentare; si tratta di una compensazione passiva, senza nessun aumento dei trasportatori del glucosio. Anche per gli amminoacidi si verifica una situazione analoga, ma non per i lipidi (Pardi et al., 2002). Anche il trasporto dell'ossigeno subisce delle modificazioni, e si ha un aumento del gradiente della  $pO_2$  a livello ombelicale, come risultato di una maggiore limitazione della diffusione e di una perfusione placentare insufficiente (Battaglia, 2002). Sono stati definiti dei parametri di normalità per valutare lo sviluppo dei diversi organi, il comportamento adattativo e la fisiologia del puledro neonato. Tuttavia

alcuni puledri appaiono normali da un punto di vista comportamentale e fisico, ma non per quanto riguarda la maturità funzionale dei vari organi, che potrebbero non essere in grado di mantenere una adeguata omeostasi in condizioni di stress (Rossdale e Ousey, 2002; Ousey et al., 2003). Rossdale e Ousey (2002) hanno ipotizzato che la “sindrome del giorno dopo”, cioè un peggioramento gravissimo delle condizioni del puledro il secondo giorno dopo il parto, sia il risultato di un ritardo di crescita intrauterino, in particolare della funzionalità polmonare e metabolica. Con i termini IUGR (ritardo di crescita intrauterino) e privazione placentare si indica uno stato clinico di malnutrizione e deficit fisiologico in quegli individui nati da una gravidanza nella quale ci siano state delle interferenze negli scambi placentari (Rossdale e Ousey, 2002).



**Figura 8.** puledro con ritardo di crescita intrauterino (IUGR) (Allen et al., 2002).

Nella specie equina, i gemelli sono considerati un modello naturale di studio di IUGR, a causa della competizione tra le due placenti per l'adesione all'endometrio. Una gravidanza gemellare si conclude

solitamente con la morte fetale, o talvolta con la nascita di puledri di dimensioni ridotte rispetto al normale, con in genere minori possibilità di sopravvivenza (Rossdale e Ousey, 2002). I puledri nati prima dei 320 giorni di gestazione mostrano evidenti segni clinici di immaturità, ma pur avendo un peso ridotto, la loro dimensione è normale in relazione all'età gestazionale. I soggetti IUGR invece presentano un ridotto peso corporeo ed uno scadente aspetto generale. A volte le anomalie riscontrate nei puledri sono solamente di tipo funzionale e si parla di dismaturità, termine coniato per la medicina umana, cioè animali che mostrano segni di prematurità benchè nati dopo i 320 giorni di gestazione (Rossdale e Ousey, 2002).

Nel puledro i potenziali effetti del ritardo di crescita intrauterino includono lo sviluppo di diverse patologie tra cui il mancato trasferimento dell'immunità passiva, a causa dell'incapacità ad alimentarsi che spesso presentano i soggetti dismaturi, e anomalie dello sviluppo scheletrico e articolare, per alterazione del processo di mineralizzazione del tessuto osseo durante la vita fetale. Anche lo sviluppo muscolare può venire interessato con una sproporzionata riduzione della massa muscolare e un'atrofia selettiva delle fibre di tipo 2 nell'adulto (Rossdale e Ousey, 2002). Nel puledro prematuro e dismaturo possono essere presenti inoltre delle alterazioni del tratto digerente che presenta una immaturità funzionale, con conseguenti alterazioni dell'assorbimento (Vaala, 2002).

Un'altra delle manifestazioni cliniche importanti dell'insufficienza placentare è la Sindrome da Asfissia Perinatale (Perinatal Asphyxia Syndrome, PAS), causata da una combinazione di ipossia e di ischemia del feto/puledro. Si tratta di una patologia multisistemica con sintomatologia molto variabile in base alla durata e all'intensità

dell'insulto, ma in cui sono quasi sempre presenti dei deficit neurologici (per esempio perdita di interesse per la madre, convulsioni, alterazione dei riflessi di suzione e di deglutizione, e vocalizzazioni anomale) (Vaala, 1994).

In passato, i puledri che presentavano questa sindrome venivano classificati in base ai segni neurologici che li caratterizzavano maggiormente, come Barkers (abbaiatori), Dummies (stupidi), Wonderers (vagabondi) e Convulsives (convulsivi), e veniva utilizzato il termine coniato da Rosedale nel 1968 "Sindrome da Maladattamento Neonatale" (NMS), ponendo quindi un particolare accento sulla sintomatologia nervosa (Vaala, 1994).

La sintomatologia neurologica è legata ad una serie di eventi biochimici e fisiologici che, in seguito ad un insulto ipossico-ischemico transitorio e reversibile, culminano con la morte delle cellule neuronali in due fasi distinte (Vaala, 1994; Wong et al., 2011). Durante la prima fase si verifica il *danno neuronale primario*: la carenza di ossigeno e glucosio a livello centrale causa una diminuzione della fosforilazione ossidativa per carenza energetica; questo comporta il malfunzionamento della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-dipendente e l'ingresso di sodio e quindi di acqua nella cellula. Inoltre, il neurotrasmettitore eccitatorio glutammato si accumula nello spazio extracellulare in conseguenza del fallimento dei meccanismi energia-dipendente di rilascio e di captazione del glutammato da parte dei neuroni. Questo accumulo determina l'apertura dei recettori canale, con ingresso dentro la cellula di sodio, di cloro, e di acqua, con conseguente lisi osmotica (Wong et al., 2011).

Durante la seconda fase, si verifica il *danno neuronale ritardato o secondario*: nel comparto intracellulare si ha un accumulo di calcio a

causa del malfunzionamento della pompa del calcio ATP-dipendente e dell'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti associati alla depolarizzazione della membrana. L'aumento di calcio intracellulare attiva una serie di meccanismi enzimatici che comprende ad esempio l'attivazione della fosfolipasi, della nucleasi e della proteasi, che portano a morte cellulare (Wong et al., 2011).

L'ipossia determina inoltre nei tessuti una modificazione dello stato redox delle macromolecole con formazione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS), rilasciati nella fase di ri-perfusione ematica. I radicali liberi causano la perossidazione dei fosfolipidi di membrana, con conseguente rottura della stessa e morte cellulare. Gli acidi grassi polinsaturi nei sistemi biologici sono infatti fra le principali molecole soggette all'attacco dei radicali, e la conseguente perossidazione può essere valutata attraverso la misura dei prodotti di degradazione generati dai ROS come la malondialdeide (MDA) (Lepage et al., 1991; Kumar et al. 2008).

Nella patogenesi dei danni neurologici sono probabilmente coinvolte anche le citochine pro-infiammatorie in corso di placentite e la risposta infiammatoria fetale. Le cellule della microglia possono essere attivate anche da un insulto di tipo ipossico-ischemico e produrre citochine pro-infiammatorie quali IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18 e TNF $\alpha$ . La conseguente risposta infiammatoria aumenta il flusso ematico regionale cerebrale e altera le funzioni dei neuroni e della microglia, con conseguente danno cerebrale ed edema citotossico (Wong et al., 2011).



## **CAPITOLO 4: INDAGINI CLINICHE PER L'INDIVIDUAZIONE DEL PULEDRO A RISCHIO**

### **4.1. MONITORAGGIO DURANTE LA GRAVIDANZA**

Le patologie del feto e della placenta prima del parto sono di solito più complesse da individuare. Una gravidanza può essere considerata “a rischio” in base ai dati anamnestici relativi alle gravidanze precedenti, o se la fattrice presenta patologie nella gravidanza in corso (Santschi e Vaala, 2011).

Una accurata valutazione clinica di una fattrice con gravidanza potenzialmente ad altro rischio inizia sempre con la raccolta dettagliata di alcuni dati anamnestici, quali le informazioni sul passato riproduttivo dell'animale, eventuali casi di parti prematuri, distacco prematuro della placenta, gravidanza gemellare, emorragie, ernia addominale o rottura del tendine prepubico a fine gestazione; devono essere raccolti inoltre dati di interesse medico come la presenza di laminite cronica e di problemi a livello pelvico (Santschi e Vaala, 2011). Si devono poi raccogliere i dati relativi alla gravidanza in corso, che deve essere monitorata con molta attenzione. Le informazioni devono riguardare lo stato dell'endometrio prima del parto e dopo il concepimento, la data esatta di copertura, il tipo di seme utilizzato, ma anche le coperture vaccinali. Il tutto deve essere completato dall'esame clinico della fattrice, comprendente palpazione transrettale, esame ecografico ed esami ematobiochimici. Informazioni utili sono anche quelle legate al postpartum sia della madre che del neonato, che comprendono anche la qualità del colostro e l'esame macroscopico della placenta (Bucca, 2006). L'identificazione precoce di qualsiasi segno di patologia in atto nella

fattrice gravida può salvare la vita sia della fattrice che del puledro stesso.

Per monitorare la salute dell'unità feto placentare nella specie equina durante la gravidanza si effettua il monitoraggio ormonale, il monitoraggio ecografico dell'unità feto-placentare e la valutazione della concentrazione degli elettroliti mammari.

#### *4.1.1 Profilo ormonale*

Generalmente vengono valutati gli estrogeni ed i progestinici, anche se la relaxina sarebbe l'indicatore più affidabile per valutare lo stato feto-placentare, ma per l'assenza di kit commerciali, la sua determinazione è scarsamente diffusa e utilizzata soprattutto a scopi di ricerca. Nei casi di agalassia viene valutata la prolattina. Vengono considerati fisiologici valori della concentrazione degli estrogeni superiori a 1000 ng/mL, mentre livelli inferiori sono considerati indice di stress fetale. Prima dei 300 giorni di gravidanza, una concentrazione estrogenica inferiore a 500 ng/mL (Bucca, 2006) è indice di grave compromissione o morte del feto, mentre valori compresi tra 500 ed 800 (Bucca, 2006) sono accompagnati da parto prolungato, diminuzione nella produzione di prostaglandine e nascita di puledri dismaturi (Ousey, 2006). Il profilo dei progestinici, essendo questi prodotti dalle ghiandole surrenali fetali, potrebbe essere utile nella determinazione dello stress fetale e delle alterazioni dell'attività corticosurrenalica fetale. In realtà la misurazione del progesterone nel plasma, durante la metà e fino a tarda gestazione, potrebbe non riflettere direttamente lo sviluppo fetoplacentare.

I progestageni sono ormoni steroidei a 21 atomi di carbonio prodotti da alcuni tessuti tra cui le ovaie, l'utero, la placenta e le ghiandole

surrenali fetali. I progestageni quantitativamente più importanti rispetto al progesterone raggiungono anche concentrazioni di 5-50 ng/ml. Due di questi, il 20 $\alpha$ -idrossi-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (20 $\alpha$ 5P) e il 5 $\alpha$ -pregnano-3 $\beta$ -20 $\alpha$ -diolo ( $\beta\alpha$ -diolo) a fine gestazione raggiungono anche concentrazioni >500 ng/ml (Allen, 2003).

Gli steroidi predominanti nel plasma materno al termine della gravidanza non sono gli stessi di quelli presenti nella vena e nell'arteria ombelicale. Generalmente la concentrazione di progestageni è maggiore nell'arteria ombelicale piuttosto che nella vena, ad indicare che non c'è prelievo di progestageni dal plasma materno all'unità fetoplacentare.

Il feto sintetizza grosse quantità di pregnenolone (P<sub>5</sub>) (>10  $\mu$ mol/minuto, a fine gestazione), il precursore di tutti gli altri progestageni. Il P<sub>5</sub> è prodotto probabilmente dalle ghiandole surrenali piuttosto che dalle gonadi, poiché la gonadectomia fetale non altera la concentrazione di progestageni nella concentrazione materna. Il P<sub>5</sub> viene poi convertito dall'unità fetoplacentare in P<sub>4</sub>, 5 $\alpha$ -Diidroprogesterone (DHP) e 20 $\alpha$ 5P (Allen, 2003).

Comunque gli ormoni materni diminuiscono nella fattrice in caso di colica, e scende valori minori di 1 ng/mL in cavalle che abortiscono (Asbury e LeBlanc, 1993).

Possiamo ritrovarci principalmente davanti a tre situazioni differenti:

- 1) Se le concentrazioni diminuiscono rapidamente può esserci morte fetale. Questa evenienza si verifica spesso in caso di stress materno, torsione uterina, colica e placentite.
- 2) Se le concentrazioni sono molto elevate, anche del 95% rispetto alle fattrici sane, indicano un'elevata attività corticosurrenalica fetale e una possibile patologia placentare. L'aumento del

cortisolo fetale è vantaggioso per la maturazione dell'asse fetale ipotalamo-ipofisi-surrenale, ma l'esposizione ad elevate concentrazioni di glicocorticoidi determina una riduzione del peso alla nascita, con conseguente compromissione dello stato di salute del neonato.

- 3) Il mancato rialzo fisiologico nel prepartum è frequente nelle intossicazioni da *Festuca arundinacea* o in fattrici con gestazioni prolungate (Ousey, 2006).

In generale, in presenza di un profilo progestinico anormale, la nascita di un puledro vitale è più frequente nelle fattrici che presentano concentrazioni elevate piuttosto che in quelle con concentrazioni basse.

#### *4.1.2 La concentrazione degli elettroliti mammari*

La determinazione della concentrazione degli elettroliti, quali il calcio (Ca), il sodio (Na) ed il potassio (K), nelle secrezioni mammarie prima del parto fornisce informazioni sull'imminenza del parto e sulla maturità del feto (Troedsson, 2007). In particolare, alcuni giorni prima del parto, si ha un diminuzione del sodio, ed un aumento del potassio e del calcio. Concentrazioni di  $Ca > 30$  mmol/L, di  $Na < 20$  mmol/L e  $K > 40$  mmol/L prima dei 310 giorni di gestazione (Bucca, 2006), associati ad altri dati relativi alla gravidanza, sono indicativi di patologie feto-placentari (Troedsson, 2007).

#### *4.1.3. Monitoraggio ecografico*

Il monitoraggio ecografico è il mezzo più affidabile e veloce per il controllo dello stato dell'unità utero-placentare e feto-placentare, sia

nelle fattrici gravide sane che in quelle che presentano una gravidanza a rischio. Questo sistema di monitoraggio prevede l'ausilio sia dell'ecografia transrettale che dell'ecografia transaddominale, e permette di eseguire il profilo biofisico fetale. Con l'ecografia transrettale si valuta la presentazione del feto e la porzione dell'allantocorion vicino alla stella cervicale. La misura transrettale del diametro dell'orbita, oltre a indicare la corretta presentazione fetale, è correlata all'età gestazionale (Bucca, 2006). L'ecografia transrettale della porzione più caudale dell'allantocorion a fine gestazione nella fattrice fornisce un'eccellente immagine della placenta in prossimità della stella cervicale (Renaudin et al., 1997). Viene misurato lo Spessore Complessivo di Utero e Placenta (SCUP) tra la porzione media dell'arteria uterina e l'allantoide, accertandosi che la membrana amniotica non sia adiacente all'allantocorion, perché ne potrebbe risultare un falso aumento dello spessore. Lo SCUP va misurato sempre nella parte ventrale dell'utero, poichè le pliche della placenta nella parte dorsale possono far aumentare lo spessore (Troedsson e Sage, 2001). Valori dello SCUP maggiori di 8 mm prima dei 300 giorni di gestazione, maggiori di 10 mm dopo i 300 giorni, o maggiori di 15 mm in prossimità del parto possono essere indicativi di placentite o aborto imminente (Troedsson e Sage, 2001).

Un'unità utero-placentare ispessita o più sottile del normale è spesso associata ad un esito sfavorevole per il feto, ma non tutte le fattrici che presentano una gravidanza a rischio mostrano delle alterazioni ecografiche, come dimostrato da Sheerin e collaboratori in uno studio effettuato nel 2003 su fattrici infettate sperimentalmente: solo il 60% ha mostrato, all'esame ecografico, un aumento dello spessore placentare e un distacco della placenta prima del parto.



**Figura 9.** Aspetto ultrasonografico della porzione caudale dell'utero in una fattrice gravida (Troedsson e Macpherson, 2011).

L'ecografia transaddominale permette di valutare la porzione craniale della placenta tramite la determinazione dello SCUP e di tracciare il profilo biofisico fetale, inizialmente studiato nell'uomo che permette di sospettare l'asfissia fetale (Santschi e Vaala, 2011).

Il profilo utilizzato in medicina umana prevede l'osservazione di quattro derivate (la presenza di atti respiratori fetali e dei movimenti del corpo, il tono muscolare del feto ed il volume del liquido amniotico) e delle variazioni della frequenza cardiaca in seguito ai movimenti fetali (reattività cardiaca). Nel corso degli anni è stata comprovata la sua utilità nel predire la salute del feto umano. Allo stesso modo, in perinatologia equina, la combinazione dell'ecografia transaddominale e transrettale ha un'importanza rilevante nella

determinazione dello stato di benessere del feto. Il profilo biofisico fetale prevede l'utilizzo di una sonda da 2,5-3,5 MHz per visualizzare il feto e di una sonda da 5,0-7,5 MHz per valutare lo spessore e l'integrità dell'unità utero-placentare (Bucca, 2006).

Nel profilo biofisico fetale del puledro si valuta:

- L'attività e la vitalità fetale.

L'attività fetale è il riflesso della funzionalità del sistema nervoso centrale ed è importante per assicurare un giusto sviluppo muscolare e scheletrico del feto, garantendo un adeguato adattamento del neonato all'ambiente esterno (Bucca, 2006). I movimenti devono essere presenti almeno ogni 20 minuti e la loro assenza spesso è associata a morte fetale. La frequenza cardiaca fetale varia in base al periodo di gestazione e di norma diminuisce con il progredire della gravidanza. Nell'ultimo mese è di  $75 \pm 7$  battiti al minuto (Reef et al., 1996), ma si possono avere aumenti della frequenza di 25-40 battiti al minuto associati ai movimenti del feto (Bucca, 2006).

La tachicardia fetale è indicativa di stress fetale e può essere la conseguenza di patologie sistemiche materne, mentre la bradicardia suggerisce una depressione del sistema nervoso centrale forse dovuta ad ipossia (Bucca, 2006).

- La profondità e la torbidità dei liquidi fetali.

La profondità dei liquidi fetali viene valutata nella parte craniale, media e caudale di ciascun lato del feto e la profondità maggiore si ha a livello del torace fetale, subito dietro i gomiti (Bucca, 2006).

Lo spessore medio del fluido allantoideo è di  $13,4 \pm 4,4$  cm, quella del liquido amniotico è di  $7,9 \pm 3,5$  cm (Reef et al., 1996).

L'eccessivo accumulo di liquidi fetali può essere causato da idroamnios o idroallantoide, patologie che si verificano spesso nel corso della gravidanza equina. Un improvviso aumento della torbidità dei liquidi fetali può essere associato all'espulsione di meconio in utero, ad un'emorragia o alla presenza di detriti infiammatori e può essere quindi sintomo di ipossia, distacco o infezione placentare.

- Dimensioni del feto.

Le dimensioni fetali dipendono dallo sviluppo placentare, in quanto esiste una correlazione tra le dimensioni del feto e la superficie placentare. La struttura anatomica che permette di valutare la grandezza del feto è principalmente il diametro aortico, strettamente correlato al peso del feto (Troedsson e Sage, 2001). L'aorta corre dorsalmente vicino alle vertebre e si visualizza il tratto in uscita dal cuore. Con il diametro aortico si può calcolare il peso del feto alla nascita tramite la seguente equazione:  $-19,63 + (29,25 \times \text{diametro aortico}) \pm 3,49 \text{ kg}$  (Troedsson e Sage, 2001). La misurazione dello stomaco fetale è semplice da ottenere, aumenta nel corso della gravidanza ed è in diretta correlazione con la deglutizione del feto. La deglutizione fetale rappresenta uno dei meccanismi per la regolazione del volume del fluido amniotico e richiede l'integrità delle strutture anatomiche e neurologiche del tratto digerente superiore del feto (Bucca, 2006).





**Figura 10.** scansione ecografica fetale per via transaddominale (McKinnon, 2011).

- Spessore e integrità dell'unità utero-placentare.

Anche la valutazione transaddominale della unità utero-placentare è di estrema importanza per escludere la presenza di edema placentare e di aree di distacco che potrebbero compromettere gli scambi materno-fetali, specialmente quando localizzati in corrispondenza del corpo dell'utero (Bucca, 2006). Anche una riduzione dello SCUP è stata associata a sofferenza fetale; uno spessore inferiore a 0,4 cm è stato infatti associato a sofferenza fetale (Reef et al., 1996). L'aumento dello SCUP è stato associato ad esito sfavorevole della gravidanza (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987), mentre Reef et al. (1996) hanno osservato che ampie aree di distacco possono risultare nella nascita di un puledro affetto da PAS. La presenza di piccole aree di distacco tra gli invogli fetali e l'utero invece non sembra avere ripercussioni sullo stato di salute del feto (Reef et al., 1995). Queste aree possono rappresentare delle

vestigia di strutture ombelicali o essere delle zone normali prive di villi (Reef, 1996). la presenza di aree di separazione, la loro estensione e progressione nel tempo sono fattori importanti nella valutazione dello stato di salute utero-placentare (Reef et al., 1995; Reef et al., 1996).

Data l'inaccessibilità delle porzioni dorsali dell'unità utero-placentare nell'approccio ecografico percutaneo addominale, è possibile che focolai di anomalie placentari passino inosservati. In ogni caso, le anomalie dello spessore utero-placentare costituiscono sempre un segno prognostico negativo per la sopravvivenza del feto (Reef et al., 1996).

## 4.2. ESAME MACROSCOPICO DEGLI INVOLGI

La conoscenza della normale anatomia e dei più comuni artefatti è fondamentale per effettuare un corretto esame della placenta e per individuare le lesioni che possono avere un significato diagnostico. Importante inoltre sapere quali campioni raccogliere, ed in che modo, per poi inviarli ad un laboratorio. L'esame della placenta può mettere a rischio di contaminazione l'intero allevamento per il rischio di trasmissione di malattie infettive. E' necessario quindi prendere opportuni provvedimenti, come indossare indumenti di protezione, effettuare pulizia e disinfezione della zona in cui è stato effettuato l'esame e degli strumenti utilizzati. L'esame di tutta l'unità placentare riveste un ruolo di fondamentale importanza per l'acquisizione di informazioni riguardo all'ambiente di vita intrauterino del puledro, e di conseguenza del suo stato di salute.



**Figura 11.** Disposizione degli involgi fetalì per la valutazione macroscopica ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

Nell'esame macroscopico gli obiettivi principali sono di valutare la completa espulsione degli invogli e di studiarne le caratteristiche anatomiche e le eventuali anomalie (Cottrill, 1991).

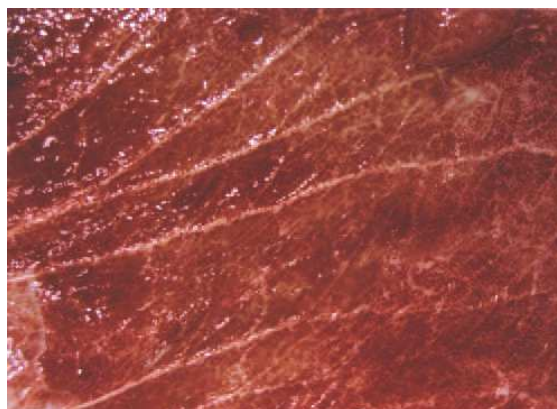
Come prima cosa è molto importante pesarla, prima che gli invogli vengano eventualmente lavati delicatamente con acqua fredda per eliminare residui di paglia o di sangue. Nel purosangue, l'insieme degli invogli pesa normalmente circa l'11% del peso del neonato (4.5-6.75 Kg). Successivamente la placenta deve essere distesa su di una superficie piana. Ogni superficie deve essere attentamente ispezionata. Generalmente, la placenta equina viene espulsa rivoltata come un guanto e mostra come superficie esterna la parte allantoidea. Se la placenta è rimasta integra, l'unico punto di discontinuità è quello attraverso il quale è nato il puledro, e di norma corrisponde alla stella cervicale. Si procede disponendo l'organo in modo da formare una "F" che abbia come base la stella cervicale. I due bracci della "F" corrispondono alle corna uterine e la porzione verticale al corpo dell'utero (Asbury e LeBlanc, 1993).

Si procede con l'osservazione della superficie corionica prima, e di quella allantoidea successivamente, rivoltando la placenta come un calzino.

La superficie corionica, se fresca, è di colore rosso intenso e al tatto appare come vellutata. Questo aspetto è dovuto alla presenza di microvilli che sulla superficie del corno non gravido appaiono più spessi, mentre sul corno gravido, vistosamente più grande, e sul corpo, sono più corti. In queste ultime due zone il corionallantoide può essere più sottile per effetto dello stiramento esercitato dal peso del feto (Morresey, 2004). Il corpo della placenta rappresenta la porzione maggiore dell'organo, ed in esso si possono rinvenire delle striscie

prive di villi in corrispondenza del passaggio dei vasi (Rossdale e Ricketts, 2002).

La membrana amniotica non è attaccata al corionallantoide nella specie equina, e questo aspetto anatomico contribuisce alla torsione del cordone ombelicale; l'amnios è infatti ancorato al cordone ombelicale. Una eccessiva torsione del cordone ombelicale è un evento relativamente comune nell'equino, ma più raro nelle altre specie in cui l'amnios è ancorato al corionallantoide. Il cordone deve essere steso, esaminato e misurato. L'amnios deve essere separato e devono essere esaminati entrambi i versanti.



**Figura 12.** aree del chorion prive di villi in corrispondenza dei vasi allantoidei (Morresey, 2004).

#### *4.2.1. Artefatti*

E' molto importante saper distinguere gli artefatti dalle lesioni vere e proprie. Ci sono molte strutture anatomiche normali che possono essere scambiate per lesioni. Tra queste le più importanti da discriminare sono un ispessimento del corno 'gravido', aree focali di edema e degenerazione del corionallantoide nei punti in cui gli arti posteriori del puledro premono contro la placenta e la parete uterina,

la presenza di vescicole corio-allantoidee, tasche corio-allantoidee in corrispondenza delle coppe endometriali, la presenza dell'ippomane, piccole aree di lieve congestione dovute a compressione, piccole aree prive di villi sulla superficie corionica (a livello di stella cervicale, in corrispondenza delle coppe endometriali, aree lineari sovrastanti grossi rami dei vasi ombelicali, aree di apposizione della placenta in caso di gravidanze gemellari, e a livello di papille delle tube uterine) (Schlafer, 2011).

L'edema può essere presente sia come manifestazione della alterata permeabilità vascolare, ed è infatti un riscontro comune nelle placenti, ma può essere anche un artefatto. Un edema importante può infatti verificarsi anche durante un parto prolungato. La placenta inoltre non possiede vasi linfatici che possano drenare i liquidi in eccesso. Anche un'eccessiva esposizione all'acqua può portare ad una imbibizione di liquidi che macroscopicamente ha l'aspetto di un edema. L'accumulo di liquidi fa aumentare di peso la placenta, parametro che viene comunemente usato per identificare placente patologiche; quindi capire quale sia la causa dell'edema è fondamentale.

L'autolisi può rendere il tessuto friabile e può sembrare che ci sia essudato infiammatorio sulla superficie. La necrosi e l'autolisi sono comunque difficilmente differenziabili macroscopicamente. I tessuti placentari in autolisi hanno un colore che va dal marrone chiaro al grigio e devono essere differenziati dalla necrosi che di solito accompagna l'infiammazione insieme all'edema, alla congestione vascolare e all'accumulo di essudato (Schlafer, 2011).

#### *4.2.2. Aspetto macroscopico patologico*

L'aspetto dell'unità feto placentare può cambiare in conseguenza di vari fattori. Sulla superficie corionica possono essere presenti ampie aree prive o con ipoplasia dei villi dovute a processi degenerativi dell'endometrio nelle fattrici anziane. Ancora è possibile evidenziare tali aree in corso di gravidanze gemellari, peraltro rare nella cavalla e spesso impossibile da portare a termine con successo per entrambi i feti (Asbury e LeBlanc, 1993). È possibile evidenziare delle gravi aree di distacco placentare, che compromettono il nutrimento del feto; queste zone hanno un colore bianco o bruno, assottigliate e prive di villi, con un'estensione più o meno ampia (Rossdale e Ricketts, 2002). La perdita della funzione di scambio della placenta avviene anche quando la gravidanza si sviluppa completamente nel corpo (le corna appaiono piccole, mentre la parte che corrisponde al corpo è allargata) e nel distacco prematuro di placenta. In quest'ultimo caso la separazione avviene più frequentemente nella zona della stella cervicale. Le zone della placenta che si separano dall'endometrio diventano congeste e appaiono di un rosso intenso (Schlafer, 2011).

L'assenza di ispessimento, necrosi e di essudato infiammatorio possono aiutare nel differenziare questa patologia dalla placentite. Alterazioni degenerative possono svilupparsi quando lo stroma dell'allantoide diventa edematoso per un periodo di tempo prolungato. L'edema del corionallantoide è un reperto comune nell'idrope dell'allantoide e può portare ad una perdita della funzionalità per la compromissione della perfusione dei tessuti. Le cause infettive di placentite, batteriche, virali o fungine, provocano lesioni tipiche, ma è sempre necessaria la conferma da parte di esami colturali. Esistono infatti poche lesioni patognomoniche. Gli eventuali essudati presenti

sulla superficie corionica assumono grande importanza perché da essi si può successivamente coltivare ed isolare l'eventuale patogeno (Asbury e LeBlanc, 1993), e permettono quindi di acquisire informazioni utili per approcciarsi meglio ad un eventuale puledro malato (Macpherson and Bailey, 2008).

La placentite è di solito associata ad un aumento di peso a causa dell'edema. Nella placentite ascendente le lesioni si trovano frequentemente nella zona della stella cervicale. Le alterazioni più evidenti si vedono sulla superficie corionica, poiché l'infezione parte dalla cervice e si estende tra l'endometrio e la membrana corionallantoidea. Le aree di infiammazione e di necrosi del corionallantoide appaiono macroscopicamente di un colore che va dal marrone chiaro al marrone scuro, sono ispessite con o senza essudato necrotico fibrinoso sulla superficie corionica (Schlafer, 2011). Le placentiti da batteri nocardiformi hanno un aspetto particolare, con lesioni estese nella zona craniale e ventrale del corpo e dell'attacco di questo con le corna. La superficie corionica è ricoperta da un essudato viscoso verdastro, con il corion che appare assottigliato (Williams et al., 2003). Nelle placentiti diffuse da leptospira invece, il corioallantoide si presenta più rosso del normale, talvolta con aree piccole e irregolari più chiare. Occasionalmente la compromissione vascolare può provocare infarti placentari che hanno un colore marrone chiaro-grigio e una linea netta di demarcazione tra il tessuto necrotico e quello sano (Poonacha et al., 1993).

L'amnionite si riscontra comunemente in casi gravi di placentite batterica o micotica, ma si osserva raramente in assenza di lesioni infiammatorie a carico del corionallantoide; di solito è accompagnata anche da funisite (Sebastian et al., 2005). L'amnios in questo caso



appare di aspetto rugoso di colore marroncino chiaro, soprattutto nella zona che ricopre il cordone. Nei casi più gravi sono attaccati alla membrana amniotica dei brandelli necrotici, e sono ben visibili necrosi e/o congestione ed edema dell'amnios e dello stroma del cordone. A carico del cordone ombelicale sono rilevabili altre lesioni, quali emorragie ed edemi dovute ad eccessiva torsione dei vasi (Schlafer, 2011).

#### 4.3. ESAME CLINICO DEL PULEDRO

Il parto è un processo relativamente rapido nella fattrice e, per meglio essere studiato, viene suddiviso in tre stadi. Il primo stadio è caratterizzato da cambiamenti comportamentali della cavalla che indicano l'inizio del travaglio. Il secondo stadio inizia con la rottura della membrana corio-allantoidea e termina con la nascita del puledro, mentre nel terzo stadio si ha l'espulsione della placenta e delle membrane fetali dopo il parto (Byars e Simon, 2011). Un'attenta osservazione del puledro da parte di personale ben addestrato dovrebbe iniziare subito dopo il parto. La prima valutazione dello stato generale del puledro può essere condotta dopo la nascita attraverso il sistema di APGAR (Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration); si tratta di uno schema interpretativo derivato dalla medicina umana, ideato per svelare precocemente stati di asfissia o di stress del neonato. Nel bambino viene eseguito a 1 e 5 minuti dalla nascita e ripetuto fino ad un massimo di 30 minuti in presenza di un punteggio basso. Nel puledro vengono valutati 5 parametri: colore delle mucose, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, tono muscolare e risposta allo stimolo nasale, e a ciascuno di essi viene

attribuito un punteggio numerico da 0 a 2 (Vaala, 2002). Un punteggio totale di 8-10 è normale, un punteggio di 6-8 è indicativo di una lieve asfissia e un punteggio inferiore a 6 indica una grave asfissia che necessita di intervento immediato (Vaala, 2002).

Lo stimolo nasale può essere accompagnato dallo stimolo del padiglione auricolare o da quello toracolombare, facendo scorrere il pollice e l'indice lungo la colonna vertebrale dalla nuca alla base della coda. Il puledro normale, in risposta a questa manualità, muove gli arti, alza la testa e cerca di alzarsi (Vaala e Sertich, 1994).

<b>Parametro</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Mucose	pallide	rosa chiaro	rosa carico
Frequenza cardiaca	assente	<60 bpm	>60 bpm
Frequenza respiratoria	assente	<30 atti/min, irregolare	>30 atti/min, regolare
Tono muscolare	decubito laterale	tenta di assumere il decubito sternale	decubito sternale
Risposta allo stimolo nasale	nessuna	debole reazione della testa	tosse, starnuto

**Tabella 1.** Apgar Score modificato utilizzato nel puledro

L'esame clinico completo può essere normalmente rimandato a qualche ora dopo. Normalmente, il puledro neonato assume la posizione sternale subito dopo la nascita. Già dopo 20 minuti dalla nascita l'animale deve presentare un buon riflesso di suzione e dopo 15-165 minuti al massimo assumere la stazione quadrupedale. Entro le prime 2 ore di vita dovrebbe nutrirsi alla mammella ed assumere del colostro di buona qualità. La prima minzione avviene dopo 6 ore circa

dalla nascita nel maschio e dopo 11 ore nella femmina, pur esistendo un'ampia variabilità individuale (Bernard e Reimer, 1994). Entro 24 ore dovrà essere completata l'espulsione del meconio e il puledro dovrà defecare le prime feci da latte, morbide e chiare. Normalmente, l'espulsione inizia dopo la prima poppata del puledro, che stimola fisiologicamente la motilità intestinale. Alla nascita bisogna valutare anche il peso del puledro, che è in relazione alla razza e corrisponde a circa il 10% del peso della fattrice (Rossdale e Ousey, 2002).

Puledri che portano la testa bassa, con orecchie cadenti, e che si addormentano in piedi danno un campanello dall'allarme sul loro stato di salute. Puledri poco vitali si alzano più raramente e quindi si alimentano anche meno. La perdita di affinità per la fattrice in un puledro è spesso associato con un danno ipossico ischemico. Il disinteresse per la mammella può essere talvolta presente anche in caso di sintomatologia colica (Axon, 2011).

La temperatura corporea deve essere compresa tra 37,2 e 38,9°C (Koterba, 1990). La temperatura rettale non è un indicatore affidabile di infezione nei neonati; spesso i puledri con sepsi acuta sono ipotermici, così come i puledri prematuri che hanno una scarsa capacità di termoregolazione (Axon, 2011).

Le mucose devono essere esaminate attentamente e in condizioni di buona visibilità, per escludere la presenza di ittero, pallore, cianosi, congestione e petecchie emorragiche. La presenza di petecchie emorragiche a livello gengivale è uno dei primi segni di setticemia, insieme all'iperemia della benda coronarica. Le petecchie possono essere presenti anche a livello di padiglione auricolare, punta del naso e terza palpebra. La frequenza cardiaca subito dopo la nascita è normalmente compresa tra 40-80 bpm, ma durante i primi tentativi di

assumere la stazione quadrupedale aumenta a 130-150 bpm o anche più. Si stabilizza poi durante i primi giorni di vita tra 70-100 bpm, anche se può aumentare notevolmente in caso di eccitazione o di paura (Koterba,1990). E' normale la presenza di un soffio sistolico causato dalla incompleta chiusura del dotto arterioso, che nella maggior parte dei puledri scompare dopo i primi giorni di vita (Vaala, 2002). Durante le prime ore dopo la nascita, la frequenza respiratoria è compresa tra 60-80 atti/minuto, per poi stabilizzarsi dopo le prime ore sui 20-40 atti/minuto (Bernard e Reimer, 1994). Il ritmo del respiro deve essere regolare e non deve essere presente sforzo respiratorio, con una contrazione addominale minima in fase espiratoria. La dispnea si manifesta normalmente con prolungamento delle fasi respiratorie, dilatazione delle narici, retrazione costale, sforzo addominale e nei casi più gravi testa estesa sul collo e fame d'aria.

A causa della parete toracica molto sottile, all'auscultazione cardiaca i toni e i rumori cardiaci sono molto più forti rispetto al cavallo adulto, e l'auscultazione polmonare è alquanto inattendibile. I suoni polmonari sono sicuramente più udibili rispetto all'adulto, ma spesso il passaggio dell'aria nei grossi bronchi maschera le anomalie delle vie più profonde. I suoni polmonari non sono quindi correlati con la gravità del processo eventualmente presente, né in un senso né nell'altro. Inoltre, anche in presenza di patologie polmonari gravi, è molto rara nel puledro la presenza di tosse e di scolo nasale (Bernard e Reimer, 1994). Per questo, l'esame radiografico del torace e l'emogasanalisi arteriosa sono così importanti componenti del protocollo diagnostico. Il torace deve essere anche palpato per escludere la presenza di fratture costali, che si possono verificare

durante il parto, specialmente nel puledro prematuro con una ossificazione incompleta o in seguito a rianimazione neonatale.

Deve essere inoltre ispezionato l'addome che può essere disteso, e la presenza di segni e atteggiamenti particolari come ripetuti tentativi di defecazione con tipico "scodinzolamento", o imbrattamento della zona perineale o dei garretti. La palpazione addominale è possibile solo in presenza di puledri sufficientemente rilassati e può mettere in evidenza costipazioni del grosso intestino (Koterba, 1990). L'addome deve essere auscultato per almeno 2 minuti bilateralmente, per verificare la presenza di borborigmi. L'auscultazione deve essere eseguita procedendo dalla fossa paralombare verso la parte ventrale dell'addome. Rumori di sciacquò possono essere sintomo di diarrea incipiente (Bernard e Reimer, 1994).

Anche se per avere informazioni più attendibili è necessario un esame ultrasonografico, come primo approccio, l'ombelico deve essere esaminato attentamente per escludere segni di infezione, aumenti di volume dovuti ad esempio ad ernie, e raccolte associate ad emorragie, accumulo di urine o infezioni. L'uso eccessivo di sostanze caustiche può aumentare l'incidenza di onfaliti (Vaala, 2002).

Lo sviluppo scheletrico e la costituzione devono essere valutate; anomalie a livello del cranio come l'asimmetria o una eccessiva prominente dell'osso frontale possono essere segno di idrocefalo, ma più spesso di ritardo di crescita intrauterino. Gli arti possono presentare eventuali deformità angolari o flessorie, eccessiva lassità tendinea e articolare (Axon, 2011). Gli animali prematuri possono presentare anche incompleta ossificazione delle ossa del carpo e del tarso. Tutte le articolazioni e le fisi dovrebbero essere palpate per la presenza di calore, dolore, gonfiore o edema, e in presenza di zoppie e

altro tipo di anomalie devono essere considerate settiche fino a che non viene dimostrato il contrario. Il tono muscolare, se ridotto o eccessivamente aumentato, è indicativo solitamente di lesioni centrali di tipo ipossico-ischemico, ma l'ipotonia può essere associata anche ad immaturità e sepsi (Axon, 2011).

#### 4.4. PARAMETRI EMATOBIOCHIMICI DEL PULEDRO ALLA NASCITA

Il puledro neonato è in un periodo di transizione tra la vita fetale e quella extrauterina. I risultati degli esami ematobiochimici in questo periodo spesso riflettono l'ambiente uterino, quindi, i risultati devono essere interpretati con la consapevolezza dei cambiamenti che avvengono nella vita intrauterina. Questi parametri possono essere utili per identificazione i puledri a più alto rischio di sviluppare segni clinici, ma il medico veterinario deve essere anche consapevole delle normali variazioni nei risultati clinico-patologici che si verificano durante il primo periodo di vita extrauterina, e dovrebbe acquisire familiarità con i risultati del proprio laboratorio e con le variazioni individuali che possono verificarsi nei valori di riferimento (Axon, 2011).

##### 4.4.1. *Ematocrito*

L'ematocrito aumenta gradualmente durante la vita fetale fino a raggiungere i valori dell'adulto a 300 giorni di gestazione. Alla nascita, l'ematocrito (PCV) è compreso tra 40 e 52%, alto a causa del trasferimento del sangue placentare al feto (Jeffcott et al. 1982; Harvey, 1990), ma solitamente questa percentuale diminuisce con l'ingestione delle proteine del colostro e l'espansione del volume di

sangue già dopo 24 ore (Palmer, 2004). Un valore di ematocrito elevato con eritrocitosi può essere associato a ipossia cronica in utero o a disidratazione. Una sua diminuzione può essere invece dovuta a perdita di sangue interna o esterna (fratture costali, emorragia dai residui ombelicali o gastrointestinale), prematurità, emolisi associata a isoeritrolisi neonatale, sepsi e CID (Axon, 2011).

#### *4.4.2. MCV*

Il volume medio cellulare (MCV) è alto durante la prima parte della gravidanza, per diminuire fino a valori simili all'adulto a 300 giorni di gestazione. L'MCV continua a diminuire fino a 3-5 mesi di vita, a causa di un certo grado di microcitosi, con conseguente lieve anisocitosi, per poi ricrescere a 9 mesi. (Harvey, 1990). La carenza di ferro è stata sospettata come causa di questa diminuzione, tuttavia, i puledri hanno adeguate riserve di ferro e la sua supplementazione non sembra modificarne i valori (Axon e Palmer, 2008).

#### *4.4.3. Eritrociti*

Il fegato fetale è l'organo principale dell'ematopoiesi durante la vita intrauterina, mentre il midollo osseo contribuisce in modo significativo all'ematopoiesi solo al termine della gestazione. Gli eritrociti raggiungono la concentrazione massima al momento del parto (Jeffcott et al., 1982).

Come nei bambini, anche nei puledri può essere presente un certo grado di anemia fisiologica. Lo stimolo per la produzione di eritrociti è infatti basso al momento della nascita, a causa della imponente trasfusione di sangue placentare che avviene dopo il parto e per l'elevata saturazione dell'emoglobina, dal momento che la pO<sub>2</sub>

arteriosa aumenta da 34 mmHg nel feto a 80 mmHg nel puledro di un'ora. L'emivita degli eritrociti nel neonato sembra inoltre essere più breve rispetto a quella dell'adulto (Harvey, 1990).

#### *4.4.4. Leucociti*

Alla nascita la conta dei globuli bianchi è simile a quella dell'adulto, tuttavia, vi è una notevole variazione nel numero dei globuli bianchi, dei neutrofili e dei linfociti. La conta linfocitaria nel puledro alla nascita è circa 1400 cellule/ $\mu$ L. Durante la gestazione i linfociti possono raggiungere valori anche superiori a 3000 cellule/ $\mu$ L, ma diminuiscono al parto per poi risalire intorno ai tre mesi di vita (Harvey, 1990). Il numero di neutrofili invece aumenta durante l'ultimo periodo di gestazione (Harvey, 1990); il rilascio di cortisolo al parto induce un aumento dei neutrofili nel periodo subito successivo, per poi iniziare a diminuire dopo il primo giorno di vita (Silver et al., 1984). La neutropenia associata alla presenza di granulazioni tossiche, e ad un numero maggiore di cellule immature è solitamente associato alla sepsi. Un rapporto neutrofili / linfociti (N/L) <2-3 senza segni di sepsi è associato alla prematurità. La neutropenia associata ad un rapporto N/L <1.5 nelle prime 24 ore di vita è un fattore prognostico negativo nei puledri prematuri. Una elevata conta leucocitaria alla nascita può rappresentare la risposta infiammatoria del feto a causa di un'infezione placentare piuttosto che una sepsi primaria nel puledro. Una conta linfocitaria persistentemente bassa può essere associata a malattia da immunodeficienza combinata (Axon, 2011).



#### *4.4.5. Piastrine*

La conta piastrinica rimane relativamente costante durante il primo anno di vita (Harvey, 1990). Le piastrine, tuttavia, nella loro prima settimana di vita hanno una ridotta funzionalità che può contribuire al tempo di sanguinamento leggermente più lungo tipico del puledro (Clemmons et al., 1984). La trombocitopenia è frequente nel puledro setticemico in corso di CID, nelle infezioni virali, nella trombocitopenia alloimmune e nella dermatite ulcerativa (Axon e Palmer, 2008).

#### *4.4.6. Proteine totali*

La concentrazione delle proteine plasmatiche varia da 4-6 g/dL alla nascita a 5-8 g/dl dopo 24 ore. La concentrazioni delle proteine totali aumenta con l'assorbimento colostrale, con la disidratazione e in caso di iperglobulinemia da infezioni cronica, che talvolta possono derivare anche da infezioni intrauterine. Concentrazioni inferiori possono essere rilevate in caso di perdita di sangue, malattie renali e gastrointestinali, e mancato trasferimento dell'immunità passiva (Axon, 2011).

#### *4.4.7. Fibrinogeno*

Il fibrinogeno è una proteina di fase acuta positiva, la cui concentrazione plasmatica può aumentare in caso di infiammazione (Clemmons, 1990). L'alterazione di questo valore è tuttavia dipendente dalla cronicità del processo infiammatorio, in quanto nel cavallo sono necessarie dalle 48 alle 72 ore perché si verifichi un aumento della fibrinogenemia; i processi infiammatori di tipo acuto potrebbero non essere svelati da una alterazione di questo parametro

(Becht e Semrad, 1985). La concentrazione di fibrinogeno aumenta gradualmente dopo la nascita; valori superiori a 4 g / L sono indicativi di una infezione o infiammazione, anche se valori inferiori non ne escludono la presenza. La presenza di iperfibrinogenemia alla nascita può essere indicativa di infezioni prenatali (Axon, 2011).

#### *4.4.8. Glucosio*

Puledri appena nati hanno una concentrazione di glucosio relativamente bassa che aumenta dopo la prima poppata. In medicina umana, i soggetti IUGR presentano concentrazioni di glucosio fetale, misurato durante il parto, molto basse rispetto a soggetti normali; inoltre nei soggetti IUGR non vi è nessuna variazione nel numero e nell'attività dei trasportatori del glucosio a livello placentare (Baumann et al., 2002). Nel feto equino l'attività corticosurrenale è minima fino a poco prima del parto, e non si ha l'aumento di glicogeno e glucosio plasmatico dipendente dal cortisolo visto in altre specie, e questo potrebbe essere la causa di una ridotta capacità gluconeogenetica a livello epatico (Axon, 2011). Valori di glucosio ematico <35-40 mg/dl nel neonato, prima della assunzione di colostro, indicano insufficienza placentare (Vaala, 1999). Nelle ore successive, l'ipoglicemia è ovviamente causata dal digiuno, da un aumento delle richieste metaboliche (sepsi, SIRS), da una ridotta gluconeogenesi (sepsi, SIRS, prematurità, stress intrauterino). L'iperglicemia può essere di origine iatrogena o causata da un eccesso di catecolamine, prematurità, ipossia, sepsi e SIRS che causano una ridotta risposta insulinica o una inappropriata gluconeogenesi (Axon, 2011).

#### *4.4.9. Lattato*

Nei neonati umani, il lattato nel sangue del cordone ombelicale al momento della nascita è considerato un indicatore di ipossia prenatale, ed è paragonabile al pH come strumento prognostico (Borruto et al., 2006). Inoltre, una elevata concentrazione di lattato nel sangue prelevato dallo scalpo o dal cordone ombelicale durante il parto, o una acidosi lattica persistente nei neonati umani sono stati considerati utili indicatori di stress fetale durante il parto (Eguiluz et al., 1983; Suidan et al., 1984a; Borruto et al., 2006). La concentrazione ematica di lattato è stata valutata anche in puledri neonati ricoverati in terapia intensiva. Un'iperlattatemia al momento del ricovero e una persistente elevata concentrazione di lattato ematico durante il ricovero sono utili indicatori prognostici (Corley et al., 2005; Henderson et al., 2008; Wotman et al., 2009). In uno studio prospettico su 88 puledri ricoverati in condizioni critiche, Castagnetti et al. (2010) hanno rilevato che negli animali non sopravvissuti, l'iperlattatemia riscontrata all'ammissione si protraeva durante tutto il periodo di ospedalizzazione, mentre nei sopravvissuti la clearance del lattato avveniva entro le prime 24 ore di ospedalizzazione. Gli stessi autori hanno suggerito che l'iperlattatemia non è uno strumento diagnostico, ma un'utile indicatore della gravità della patologia e della necessità di un intervento precoce e aggressivo. Anche in cavalli adulti con sintomatologia colica, la concentrazione ematica di lattato è stata indicata come una variabile utile per l'indicazione prognostica (Furr et al., 1995; Johnston et al., 2007) ed, in uno studio condotto da Tennent-Brown et al. (2010) su animali adulti ricoverati in condizioni di emergenza, la prognosi per la sopravvivenza peggiorava se la clearance del lattato era ritardata. La misurazione del lattato nel

liquido amniotico (AF) è stata raramente presa in considerazione nella letteratura scientifica. In donne nel terzo trimestre di gravidanza e in buono stato di salute, Fadel et al. (1979) hanno riportato una concentrazione di lattato nel liquido amniotico ( $8,576 \pm 2,20$  mmol/L) di circa sei volte superiore a quello del sangue materno ( $1,316 \pm 0,66$  mmol/L). Più di recente, Brace e Cheung (2005) hanno studiato le variazioni prima del parto della concentrazione del lattato nel liquido amniotico negli ovini, ed hanno trovato una significativa correlazione positiva tra il lattato nel liquido amniotico e le concentrazioni plasmatiche di lattato fetale. Nello stesso studio, la concentrazione di lattato amniotico aumenta col progredire della gestazione, con un picco negli ultimi 1-2 giorni di gravidanza.

In studi clinici condotti sulle donne, la concentrazione di lattato amniotico è stata utilizzata come indicatore di una sospetta rottura precoce delle membrane (amnios e corion) e di un parto imminente (Wiber-itzel et al., 2005, Wiber-itzel et al., 2006; Wiber-itzel et al., 2009). Inoltre, alte concentrazioni di lattato amniotico sono state fortemente associate a parto distocico (Wiber-itzel et al., 2008); basse concentrazioni di lattato amniotico ( $<10,1$  mmol / l) sono state invece associate ad una maggiore probabilità di parto vaginale spontaneo (Wiber-itzel et al., 2010). Castagnetti et al. (2009), in uno studio preliminare, hanno valutato per la prima volta la concentrazione di lattato nel liquido amniotico nella specie equina.

#### *4.4.10. Creatinina e Urea*

La creatininemia è più elevata durante le prime 36 ore dal parto. Aumenti delle concentrazioni di creatinina ed urea possono essere dovute a cause prerenali, renali, e postrenali. Nei puledri neonati

concentrazioni della creatinina marcatamente elevate alla nascita riflettono non tanto la funzionalità escretoria del neonato, ma possono verificarsi a causa di problemi dei tessuti fetoplacentari, e sono considerate un indicatore potenziale di compromissione del puledro (Adams,1990). Se l'aumento è dovuto a problemi placentari, la concentrazione della creatinina diminuisce rapidamente nei giorni successivi; se invece la concentrazione di creatinina rimane elevata, o diminuisce lentamente, andrebbero presi in considerazione concomitanti problemi renali o altre cause di azotemia (Vaala e Sertich, 1994; Vaala, 1999). Anche se non sono stati identificati parametri specifici altamente indicativi di encefalopatia neonatale nei puledri, in uno studio retrospettivo su 78 puledri neonati, il 32% di loro mostrava un aumento della concentrazione della creatinina sierica (Bernard et al., 1995). L'urea non è generalmente elevata insieme alla creatinina nella disfunzione placentare, ma un suo aumento nei neonati è associato al catabolismo proteico (Axon, 2011). Dal 3° giorno ai 2 mesi di vita l'urea cala notevolmente, probabilmente a causa dell'aumentata richiesta di aminoacidi per la sintesi proteica (Bauer, 1990).

## **SEZIONE B: PROVE SPERIMENTALI**

### **CAPITOLO 5**

#### **5.1. SCOPI DEL LAVORO**

Lo scopo di questa tesi è stato quello di approfondire i diversi aspetti clinici e clinico-patologici dell'insufficienza placentare nella specie equina, con l'intento di individuare dei parametri che possano essere di ausilio per l'identificazione precoce del puledro a rischio e della necessità di un intervento terapeutico.

La parte sperimentale si articola quindi in 4 prove, ciascuna con scopi differenti:

- I. Utilizzo del lattato ematico ed amniotico per la valutazione del puledro neonato.
  - Determinazione dei valori fisiologici della concentrazione venosa di lattato nel puledro sano e in quello malato, nelle prime 72 ore di vita;
  - Determinazione della concentrazione di lattato nel liquido amniotico prelevato durante il parto e della sua utilità nel monitoraggio della salute del puledro nel *peripartum*;
  
- II. Valutazione della risposta all'ipossia nel puledro neonato.
  - Valutazione dell'espressione di HIF-1 $\alpha$ , HSF1 e della concentrazione di MDA nel liquido amniotico e nel sangue del puledro neonato.

*III. Parametri ematobiochimici indicatori di funzionalità placentare.*

- Utilizzo delle concentrazioni ematiche di glucosio, creatinina, urea, e fibrinogeno, come indici della funzionalità placentare.
- Utilizzo di questi parametri biochimici come fattori diagnostici e prognostici nel puledro neonato.

*IV. Analisi d'immagine della placenta mediante software ImageJ.*

- Sviluppo di una macro per il software di analisi d'immagine ImageJ, in grado di identificare e quantificare i parametri morfometrici dei villi allantocoriali.
- Relazione tra i parametri morfometrici placentari e i parametri ematobiochimici del puledro al momento della nascita.

## **5.2. MATERIALI E METODI**

### *5.2.1. SELEZIONE DEGLI ANIMALI*

Sono state incluse nello studio tutte le cavalle ricoverate presso l'Unità di Perinatologia Equina “Stefano Belluzzi” nel corso di tre stagioni riproduttive. Le fattrici sono state ricoverate a circa 310 giorni di gestazione, e sono state tenute sotto osservazione per almeno 7 giorni dopo il parto. Le cavalle sono state alloggiate in ampi box con lettiera in paglia, ed alimentate con fieno ad libitum e concentrati due volte al giorno; durante il giorno avevano accesso ai paddock esterni.

I puledri sono stati classificati come sani in base ad un punteggio Apgar  $\geq 9$ , esame clinico ed esami collaterali nei limiti della norma durante tutto il periodo di ricovero e concentrazione sierica di IgG  $\geq 800$  mg/dL a 18 ore di vita. I puledri sopravvissuti sono quelli che sono stati dimessi vivi dall'unità.

La popolazione è stata quindi suddivisa in due gruppi:

**Gruppo 1:** fattrici che hanno partorito puledri sani dopo una gravidanza fisiologica.

**Gruppo 2:** fattrici che hanno partorito puledri malati dopo una gravidanza fisiologica o ad “alto rischio”.

### *5.2.2 RACCOLTA DEI DATI E DETERMINAZIONI EMATOBIOCHIMICHE*

Per ogni *fattrice* sono stati raccolti i seguenti dati: età e numero di gravidanze, durata della gravidanza (giorni), lunghezza della fase espulsiva (minuti), concentrazione di lattato nel liquido amniotico,



concentrazione di glucosio e lattato nel sangue venoso al momento del parto, presenza di distocia, presenza di alterazioni all'esame macroscopico degli invogli fetali (edema, aree diffuse di ipoplasia dei villi, aree di distacco placentare, peso ridotto o aumentato).

I seguenti dati sono stati raccolti invece per ogni *puledro*: concentrazioni di lattato nel sangue ombelicale arterioso e venoso, pH venoso,  $pCO_2$ , punteggio Apgar entro 10 minuti dalla nascita, concentrazione ematica di glucosio, creatinina, urea, fibrinogeno, ematocrito e numero di eritrociti al momento della nascita, concentrazione di lattato nel sangue venoso al momento della nascita ed ogni 12 ore fino a 72 ore di vita (T0-T72), e insorgenza di malattia neonatale.

La Distocia è stata definita come una fase espulsiva di durata superiore ai 30 minuti, risolta dall'intervento veterinario mediante parto vaginale assistito o controllato (Norton et al., 2007).



**Figura 13.** Prelievo di liquido amniotico al momento del parto.

Il *liquido amniotico* è stato raccolto entro 5 minuti dalla comparsa del sacco amniotico attraverso la vulva, utilizzando una siringa sterile da 60 ml. Il campione è stato immediatamente portato in laboratorio e

centrifugato a 2200 x g per 10 minuti; il surnatante è stato suddiviso in piccole aliquote in provette di polipropilene da 10,0 ml; i campioni sono stati conservati a -20° C e analizzati entro 2 mesi dalla raccolta. Immediatamente dopo la nascita è stato effettuato un prelievo di sangue dalla vena e dall'arteria ombelicale per valutare la concentrazione di lattato.



**Figura 14.** Prelievo di sangue dal cordone ombelicale al momento della nascita.

Entro 5 minuti dalla nascita, per eseguire un emogasanalisi, il sangue venoso dei neonati è stato prelevato anaerobicamente con una siringa da 1 ml il cui spazio morto è stato riempito con eparina sodica (1000 UI/ml). Il campione è stato analizzato entro 10 minuti dal prelievo. Gas ematici e pH sono stati corretti per ovviare alla divergenza tra temperatura di lavoro dell'analizzatore (37°C) e quella del puledro rilevata al momento del prelievo. Le determinazioni sono state eseguite con l'emogasanalizzatore Roche OptiCCA (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, Indiana, USA).

Entro 10 minuti dalla nascita, il sangue venoso delle fattrici e dei puledri è stato raccolto dalla vena giugulare per la valutazione dei

*parametri ematobiochimici.* La glicemia è stata misurata immediatamente con il glucosimetro portatile Medisense® Optium (Abbott laboratories, Medisense products, Bedford, MA, USA).



**Figura 15.** Puledro in posizione sternale subito dopo la nascita.

Il campione di sangue è stato posto in provette S-Monovette® Sarstedt con K3-EDTA, conservato a temperatura di refrigerazione (0-4°C), ed analizzato entro 24 ore dal prelievo. Prima delle determinazioni analitiche, è stato sottoposto ad agitazione con Vortex (Reamix 2789) per un minuto. L'esame emocromocitometrico è stato eseguito con il contaglobuli automatico CELL-DYN 3500R (Abbott laboratories, Santa Clara, California, USA).

Per la determinazione di creatinina e urea, il sangue è stato raccolto in provette (Monovette ® Sarstedt) con “gel clotting activator” e centrifugato entro un'ora dal prelievo a 2200 x g per 10 minuti. Successivamente è stato separato in quattro aliquote e mantenuto a temperatura di refrigerazione (0-4°C) fino all'esecuzione delle determinazioni richieste, avvenute entro 24 ore dal prelievo.

La determinazione del fibrinogeno plasmatico è stata eseguita con una metodica di tipo turbidimetrico (Fibrinogeno turbidimetrico, MeDia Diagnostics). Il sangue è stato posto in provette S-Monovette® Sarstedt contenenti Sodio Citrato in soluzione 0,11 mmol/l, con rapporto Sodio/Citrato 1:9 e conservato a temperatura di refrigerazione (0-4°C) per massimo un'ora dal prelievo. Per separare il plasma dal citrato, il campione è stato centrifugato entro un'ora dal prelievo a 2200 x g per 10 minuti.

Per la misurazione del lattato, il sangue è stato invece raccolto in provette S-Monovette® Sarstedt contenenti come anticoagulante fluoruro di sodio e ossalato di potassio, centrifugato per 10 minuti a 2200 x g immediatamente dopo il prelievo; separato il surnatante, è stato conservato in aliquote congelate a -20°C per un massimo di 2 mesi.

Tutti i parametri biochimici sono stati determinati utilizzando l'analizzatore automatico Chemistry Analyzer AU400 (Olympus Diagnostica GmbH, Lismeehan, Irlanda).

Per determinare la concentrazione di lattato l'analizzatore utilizza un metodo enzimatico colorimetrico considerato il gold standard (limite di rilevazione 0,001 mmol/L; linearità 0,22-13,32 mmol/L; coefficiente di variazione intra-saggio 0,6-0,8%). In presenza di lattato ossidasi, il lattato viene ossidato a piruvato e perossido d'idrogeno. Per azione di una perossidasi (POD), il perossido d'idrogeno reagisce con il TOOS [N-etil-N-(2-idrossi-3-sulfopropil)-3-metilanilina], formando un composto la cui intensità di colore è proporzionale alla concentrazione di lattato presente nel campione che viene letta dallo spettrofotometro, regolato su una lunghezza d'onda di 550 nm. Inoltre, poiché le concentrazioni di lattato nel liquido amniotico erano al di

sopra del limite superiore di linearità, è stata effettuata una breve validazione del metodo analizzando tre volte 2 campioni altamente concentrati in diluizioni seriali. Impostando sull'analizzatore chimico una diluizione automatizzata nel caso di concentrazione di lattato superiore alla gamma dinamica, il metodo è risultato lineare fino a 23 mmol/L, con un coefficiente di correlazione  $R^2 = 0,9948$ .

Sui campioni di plasma in sodio citrato e sul liquido amniotico è stata misurata inoltre la concentrazione di *Malondialdeide* (MDA), e valutata l'espressione di *HIF-1 $\alpha$*  e *HSF1*. L'espressione di HSF1 e HIF-1 $\alpha$  è stata valutata mediante elettroforesi monodimensionale seguita da immunoblotting, impiegando anticorpi specifici poli e monoclonali rispettivamente. L'espressione è stata quantificata mediante Quantity One Software (Bio-Rad) ed i risultati espressi in unità arbitrarie. La MDA, dopo opportuna estrazione dal plasma e dal liquido amniotico, è stata dosata in HPLC ed espressa in unità di assorbanza (UA) (Lepage et al., 1991).

Subito dopo il secondamento, gli *invogli fetali* sono stati pesati e successivamente distesi per eseguire l'esame macroscopico. Sono stati effettuati dei prelievi di dimensioni omogenee di circa 10x5 cm, sia dall'allantocorion che dall'allantoamnios. Al fine di garantire un opportuno confronto tra i diversi soggetti, i campioni sono stati ottenuti sempre dallo stesso distretto degli invogli fetali: n.1 corrispondente alla base del corno gravido (CG), n.1 alla base di quello non gravido (CNG) e n.1 alla porzione centrale del corpo (C). In caso di alterazioni macroscopiche evidenti, sono stati fissati anche ulteriori campioni. I campioni sono stati posti in contenitori di polipropilene preriempiti con formalina al 10% neutra tamponata, e successivamente sono stati inclusi in paraffina. Le inclusioni venivano

lasciate per 20 minuti in soluzione di paraffina e xilolo, e successivamente altri 20 minuti per tre volte in miscele contenenti un volume sempre maggiore di paraffina fino ad una soluzione pura al 100%. Quando i campioni erano completamente imbevuti di paraffina si lasciavano solidificare e si procedeva con la preparazione di sezioni dello spessore di 3-5  $\mu\text{m}$  mediante microtomo e al successivo montaggio su vetrini super frost polilisinati. Tutte le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina. L'analisi morfometrica è stata effettuata usando tecniche standardizzate e tecniche di elaborazione dell'immagine computer-assistita mediante un software denominato ImageJ (un programma Java di elaborazione delle immagini di dominio pubblico, creato da W. Rasband del Dipartimento di Ricerca dell'Istituto Nazionale per la Salute Mentale di Bethesda, MD). La visione dei preparati è avvenuta con microscopio ottico integrato con una macchina fotografica digitale Leica, con la quale si è proceduto all'acquisizione di microfotografie utilizzando un obiettivo 20X ed il software di acquisizione dell'immagine IrfanView.

Le fotografie sono state acquisite in bianco e nero tangenzialmente al corion per includere le arborizzazioni basali dei villi. Successivamente le immagini sono state manipolate con comandi di elaborazione grafica (feature extraction) per rendere il software in grado di discriminare tra oggetto d'interesse (foreground) e sfondo (background). Tali comandi sono stati registrati in una macro testata anche su un campo vuoto, un campo pieno e sulla misura di un cerchio di dimensione nota come settaggio prima delle misurazioni.

In ogni fotogramma sono stati misurati i parametri di seguito riportati:

1. numero di arborizzazioni;
2. area totale delle arborizzazioni;

3. area media delle arborizzazioni;
4. percentuale di campo pieno occupata dalle arborizzazioni;
5. perimetro delle arborizzazioni;
6. circolarità (descrittore di forma= $4\pi \cdot \text{area} / \text{perimetro}^2$ ):  
Circonferenza di un cerchio di area equivalente divisa per il perimetro effettivo della particella. Più sferica è la particella più la circolarità tende a 1; più allungata o spigolosa è la particella minore è la circolarità;
7. solidità (descrittore di forma=  $\text{area} / \text{area convessa}$ ):  
area dell'oggetto divisa per l'area di un immaginario poligono che racchiude il nostro oggetto. La solidità ha valori compresi nell'intervallo 0-1;
8. rapporto perimetro/area (calcolato dai punti 5 e 2).

Tutte le procedure sugli animali sono state effettuate previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna, ai sensi del DL 116/92, approvato dal Ministero della Salute. Un consenso informato orale è stato fornito dai proprietari.

Alcuni campioni non sono stati raccolti su alcuni animali o i risultati non sono stati registrati, e non sono quindi disponibili per lo studio.

### 5.2.3. ANALISI STATISTICA

#### Utilizzo del lattato ematico ed amniotico per la valutazione del puledro neonato.

Il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare i dati raccolti al momento del parto (T0) tra i due gruppi. Un modello lineare generale (GLM) per misure ripetute è stato utilizzato per valutare le concentrazioni di lattato nel tempo nei puledri, e per

confrontare le concentrazioni nel tempo tra i soggetti (puledri sani e malati). Poiché l'ipotesi della sfericità della varianza-covarianza della variabile dipendente, valutata mediante il test di Mauchly, non è stata rispettata, la significatività del valore di  $F$  è stata valutata dopo un adeguamento dei gradi di libertà del numeratore e del denominatore con il valore più basso di epsilon.

Infine è stata eseguita un'analisi di regressione lineare per indagare la relazione tra la concentrazione di lattato nel liquido amniotico e le variabili esplicative. Le variabili con valori  $F < 0,20$  sono stati inseriti nel modello. In particolare, la variabile dipendente “concentrazione di lattato nel liquido amniotico” è stata messa in correlazione con le seguenti variabili indipendenti: età e numero di gravidanze della cavalla, durata della gravidanza, pH venoso del puledro, glicemia del puledro e della fattrice, punteggio di Apgar, lattatemia della vena ombelicale, lattatemia dell'arteria ombelicale, durata della fase espulsiva, lattatemia del puledro a T0, verificarsi di distocia. Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando un software commerciale (SPSS, versione 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

#### *Valutazione della risposta all'ipossia nel puledro neonato.*

Il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare la concentrazione di MDA e l'espressione di HSF1, ed HIF-1 $\alpha$  tra puledri sani e malati. Il test di Wilcoxon per dati appaiati è stato utilizzato per valutare l'andamento nel tempo (T0-T12) di MDA, HSF1 e HIF-1 $\alpha$ . Il test di Spearman è stato infine utilizzato per valutare le correlazioni tra HSF1, HIF-1 $\alpha$  ed MDA sia ematici che del



liquido amniotico, ematocrito, numero di eritrociti, pH e pCO<sub>2</sub> venosi, e lattato. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

*Parametri ematobiochimici indicatori di funzionalità placentare.*

Il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare le concentrazioni di glucosio, creatinina, urea e fibrinogeno tra puledri clinicamente sani e affetti da patologia, tra sopravvissuti e non sopravvissuti, e tra puledri con placente normali e patologiche all'esame macroscopico. In caso di un risultato significativo è stata eseguita una analisi Receiver Operator Characteristics curves (ROC curve); queste esaminano la performance del test lungo tutto il range dei valori possibili. Un'area sotto la curva uguale a 1 indica un test perfetto mentre un'area di 0.5 indica un test che ha le stesse probabilità di classificare del "lancio di una moneta". Le coordinate di ogni punto della curva sono il tasso di veri positivi pari alla sensibilità (asse y) ed il tasso di falsi positivi, pari a  $1 - \text{specificità}$  (asse x), in corrispondenza di un certo cut-off. L'area sotto la curva ROC esprime il "potere diagnostico" del test. La peggior curva possibile è quella che giace tutta sulla diagonale principale (potere informativo del test = nullo, area sotto la curva = 0,50). Il test è tanto migliore quanto più la ROC è spostata verso la parte sinistra e dorsale; il test perfetto ha una ROC che coincide con i due lati (quello a sinistra e quello in alto: potere informativo massimo, assenza di errori, area sotto la curva = 1). Il punto più vicino all'angolo in alto a sinistra della curva ROC corrisponde al miglior cut-off, nel senso di massimizzazione dell'utilità attesa.

*Analisi d'immagine della placenta mediante software ImageJ.*

Il test di Spearman è stato utilizzato per valutare le differenze morfometriche nelle aree di placenta corrispondenti al corpo, al corno non gravido e al corno gravido tra puledri sani e malati, e per valutare le correlazioni con i parametri ematobiochimici.

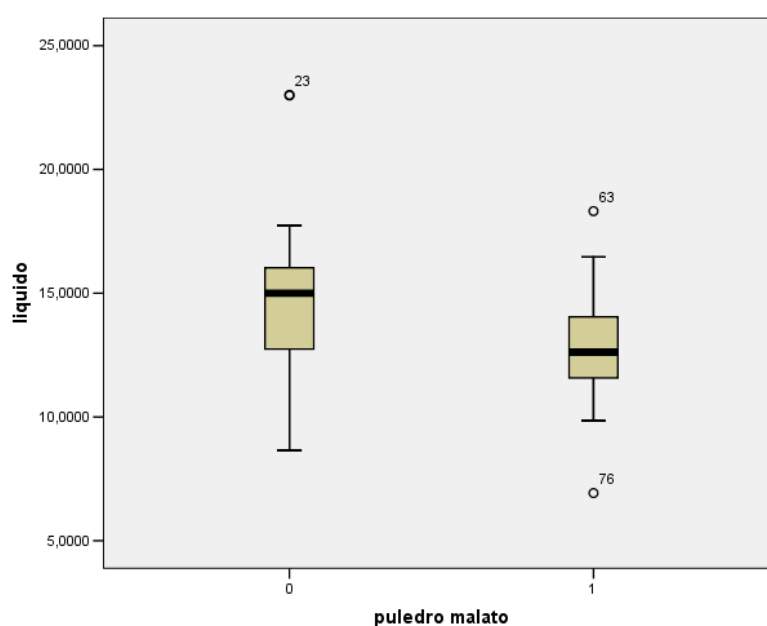
### **5.3. RISULTATI**

#### *Lattato ematico ed amniotico per la valutazione del puledro neonato.*

Ottantuno cavalle sono state utilizzate per questa prova: 62 hanno partorito puledri sani con un parto eutocico e sono state incluse nel **Gruppo 1**, e 19 hanno partorito puledri malati, e sono quindi state incluse nel **Gruppo 2**. Sette cavalle del gruppo 2 hanno presentato un parto distocico: una distocia è stata risolta mediante parto vaginale controllato e 6 risolte con parto vaginale assistito. Nel Gruppo 2, 8 cavalle presentavano una gravidanza ad “alto rischio”, individuata sulla base dei dati anamnestici e/o rilievi ecografici. Le diagnosi cliniche dei puledri malati includevano la Sindrome da Asfissia Perinatale (n=16), la prematurità/dismaturità (n=2) e la sepsi (n=1). Nel Gruppo 1, tutti i puledri (100%) sono stati dimessi. Nel Gruppo 2, sei (31,6%) puledri sono morti (due puledri sono morti entro T12, 2 entro T48, e due puledri dopo il T72) e 13 (68,4%) sono stati dimessi. In entrambi i gruppi, la concentrazione mediana di lattato ematico a T0 è risultata più alta nei neonati rispetto alle fattrici ( $p < 0,01$ ), mentre la differenza di lattato ematico a T0 tra puledri sani e malati non era statisticamente significativa ( $p = 0,17$ ). La variazione nel tempo delle concentrazioni di lattato ematico nei puledri sono mostrati nella Figura 1. Il monitoraggio della concentrazione di lattato nel sangue ha mostrato una significativa diminuzione tempo-dipendente a T24 sia nei puledri sani che nei malati ( $p < 0,01$ ). L'insorgenza della malattia nei puledri non ha modificato la variazione nel tempo della concentrazione di lattato, come valutato da una interazione tra fattori non significativa ( $p = 0,25$ ). Una differenza significativa ( $p = 0,04$ ) è

stata rilevata nella concentrazione di lattato nel liquido amniotico tra i gruppi 1 (media 14,99 mmol/L) e 2 (media 12,61 mmol/L).

La concentrazione media di lattato amniotico è risultata pari a 14,47 mmol/L (range 9,84-23,01 mmol / L) in 56 cavalle con parto eutocico, e pari a 12,53 mmol/L (range 6,92-18,31 mmol/L) nelle 7 cavalle con parto distocico.



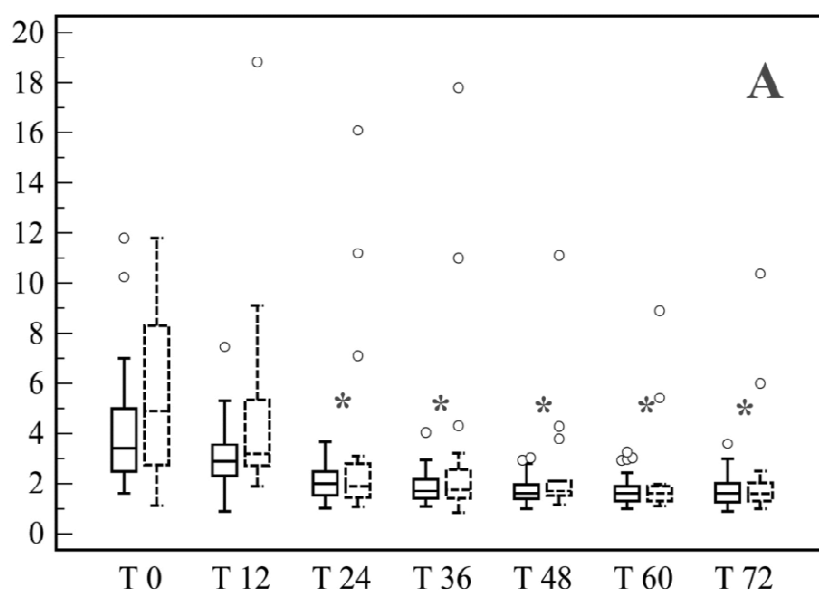
**Figura 16.** Concentrazione di lattato (mmol/L) nel liquido amniotico nei puledri sani (0) e malati (1). Il box centrale rappresenta i valori dal 25° al 75° percentile. La linea centrale rappresenta la mediana. Le linee orizzontali rappresentano il range, esclusi i valori "outside" e "far out" indicati come punti separati.

Il modello di regressione lineare in cui sono stati inseriti tutti i puledri (n = 81), ha mostrato una correlazione significativa tra il lattato amniotico ed il punteggio Apgar ( $R = 0,359$ ,  $p < 0,01$ ), la glicemia delle fattrici ( $R = 0,270$ ,  $p < 0,01$ ), ed il pH venoso dei puledri

( $R = 0,238$ ,  $p = 0,02$ ). Una correlazione negativa è stata invece trovata tra lattato amniotico ed il numero di gravidanze ( $R = -0,232$ ,  $p = 0,02$ ), e con la lattatemia dei puledri a T0 ( $R = -0,220$ ,  $p = 0,02$ ).

Quando solo i puledri sani (Gruppo 1) sono stati inclusi nel modello di regressione, il lattato amniotico è risultato significativamente correlato alla glicemia delle cavalle ( $R = 0,367$ ,  $p < 0,01$ ) e al punteggio di Apgar ( $R = 0,239$ ,  $p = 0,03$ ).

Al contrario, quando sono stati considerati solo i puledri malati (Gruppo 2), il modello di regressione ha mostrato una relazione significativa tra il lattato amniotico e la durata della fase espulsiva ( $R = 0,461$ ,  $p = 0,02$ ). Il modello di regressione comprendente tutti gli animali è riportato in Tabella 2.



**Figura 17:** Andamento nel tempo della lattatemia nelle prime 72 ore di vita nei puledri sani e malati. Il box centrale rappresenta i valori dal 25° al 75° percentile. La linea centrale rappresenta la mediana. Le linee orizzontali rappresentano il range, esclusi i valori "outside" e "far out" indicati come punti separati. Linee piene: puledri sani; linee tratteggiate: puledri malati. L'asterisco (\*) indica una differenza statisticamente significativa rispetto al T0.

	<b>T0</b>	<b>T12</b>	<b>T24</b>	<b>T36</b>	<b>T48</b>	<b>T60</b>	<b>T72</b>
<b>Sani</b>	3,92 ±2,07	2,98 ±1,15	2,06 ±0,68	1,83 ±0,59	1,72 ±0,49	1,71 ±0,56	1,73 ±0,61
<b>Malati</b>	5,93 ±3,81	4,97 ±4,17	3,50 ±4,15	3,39 ±4,39	2,59 ±2,51	2,28 ±2,10	2,53 ±2,57

**Tabella 2.** Concentrazione del lattato ematico (mmol/L) espressa come media ± DS nei puledri sani e malati.

	Gruppo 1		Gruppo 2		P
	Mediana (25°-75°)	n	Mediana (25°-75°)	n	
Età della fattrice (anni)	9 (7 – 14)	60	13 (11.00 - 16.50)	19	0.03*
Numero di gravidezze	2 (1 – 4)	54	6 (2.5 - 7.5)	19	0.02*
Durata della gravidezze (giorni)	342 (336 – 347)	61	338.5 (332.5 – 347)	18	0.61
Durata della fase espulsiva (minuti)	15 (10 - 15.5)	59	15 (10 – 20)	16	0.33
pH venoso del puledro	7.33 (7.31 – 7.36)	44	7.30 (7.20 – 7.35)	15	0.04*
APGAR score	10 (9 – 10)	62	7 (5 – 8)	18	<0.01*
Glicemia puledro (mmol/L)	4.39 (3.73 – 5.48)	55	3 (1.63 – 4.53)	18	0.02*
Glicemia fattrice (mmol/L)	7.22 (6.39 – 8.83)	44	6.78 (4.96 – 8.76)	13	0.24
Lattato puledro a T0 (giugulare) (mmol/L)	3.60 (2.30 - 4.99)	57	5.05 (2.86 - 8.90)	18	0.07
Lattato vena ombelicale (mmol/L)	4.00 (3.20 - 4.65)	23	5.40 (3.30 - 5.62)	7	0.23
Lattato arteria ombelicale (mmol/L)	4.60 (3.95 - 5.35)	11	4.00	1	/
Lattato liquido amniotico (mmol/L)	14.99 (12.68 - 16.03)	49	12.61 (11.45 - 14.18)	14	0.04*

**Tabella 3.** Dati clinici e determinazioni raccolti al parto (T0) nei Gruppi 1 e 2. I dati sono espressi come mediana (25°-75° percentile); n=numero di campioni. L'asterisco (\*) indica differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

Variabili esplicative	B	R	R <sup>2</sup>	p
Intercetta	8.335	/	/	0.000
Apgar score	0.449	0.359	0.129	0.013
Glicemia fattrice a T0	0.017	0.421	0.177	0.034
Durata della fase espulsiva	0.024	0.448	0.200	0.069
Lattatemia puledro a T0	-0.146	0.467	0.218	0.200

**Tabella 4:** Analisi multivariata di regressione lineare che include tutti i puledri della prova. Il valore P del modello era <0.001. B indica il coefficiente di regressione delle variabili esplicative, un valore positivo significa che le variabili esplicative e dipendente (concentrazione di lattato nel liquido amniotico) sono direttamente proporzionali. La forza di associazione è rappresentata dai coefficienti R e R<sup>2</sup>, mentre la significatività è indicata dal valore p.



Valutazione della risposta all'ipossia nel puledro neonato.

Per questa prova sono stati utilizzati 12 puledri sani e 6 affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS).

Su tutti i campioni è stata misurata la concentrazione ematica di MDA, ed in 9 dei 16 campioni (4 animali sani e 5 malati) è stata anche valutata l'espressione di HIF-1 $\alpha$  e HSF1.

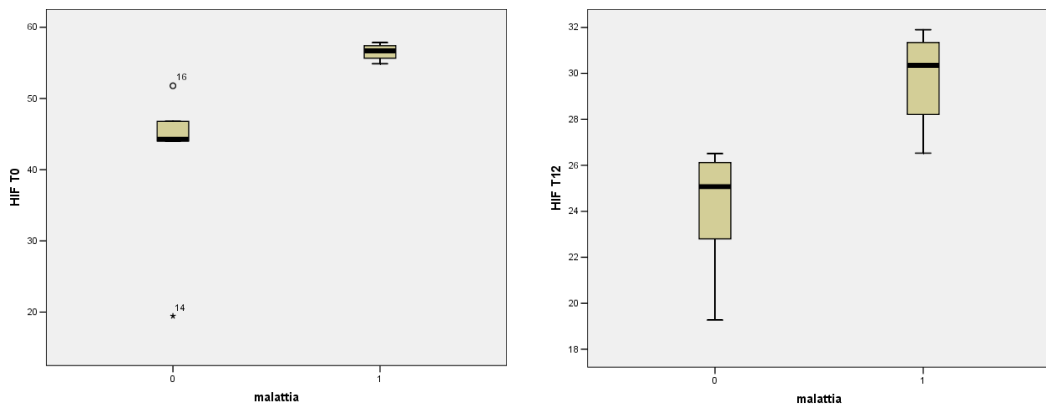
La concentrazione di MDA e l'espressione di HIF-1 $\alpha$  e HSF1 è stata inoltre valutata in 9 campioni di liquido amniotico di puledri sani. L'espressione dell'HIF-1 $\alpha$  differisce significativamente tra puledri sani e malati sia a T0 che a T12 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 18**). La concentrazione di MDA, l'espressione dell'HIF-1 $\alpha$  e quella dell'HSF1 misurate nel plasma sono diminuite significativamente a T12 ( $p < 0,05$ ).

	HIF-1 $\alpha$ plasma	HSF-1 plasma	MDA plasma	HIF-1 $\alpha$ L.A.	HSF-1 L.A.	MDA L.A.
<b>n.</b>	5	5	5	9	9	9
<b>Mediana</b>	90,42	83,65	0,29	56,44	80,15	0,21
<b>25° perc.</b>	74,63	78,59	0,24	49,44	63,48	0,13
<b>75° perc.</b>	107	88,16	0,38	57,41	121,54	0,31

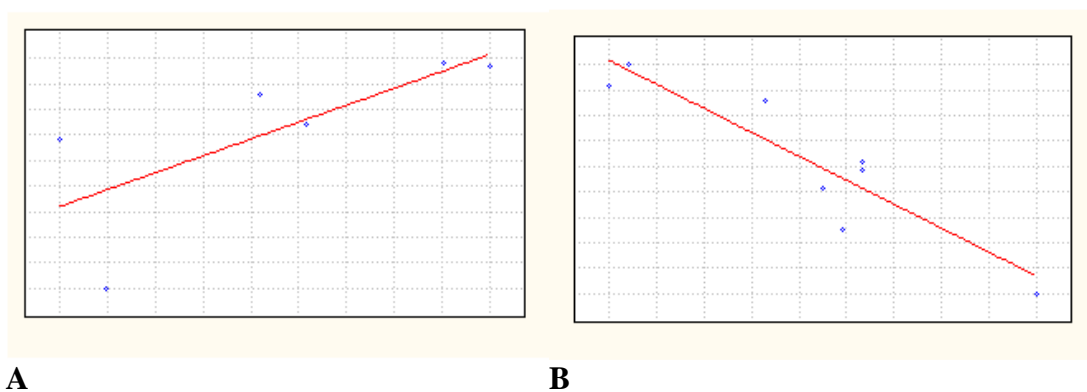
**Tabella 5.** Determinazioni a T0 nel plasma e nel liquido amniotico (L.A.). Sono riportati il numero di campioni (n), la mediana ed il 25° e 75° percentile. I risultati dell'HIF-1 $\alpha$  e dell'HSF-1 sono espressi in unità arbitrarie, mentre la MDA è espressa in unità di assorbanza (UA)

L'espressione dell'HIF-1 $\alpha$  ematica è risultata correlata significativamente con la pCO<sub>2</sub> a T0 e con l'MDA a T12 ( $p < 0,05$ ;  $R = 0,83$  e  $R = -0,72$ , rispettivamente). Alla nascita, l'espressione

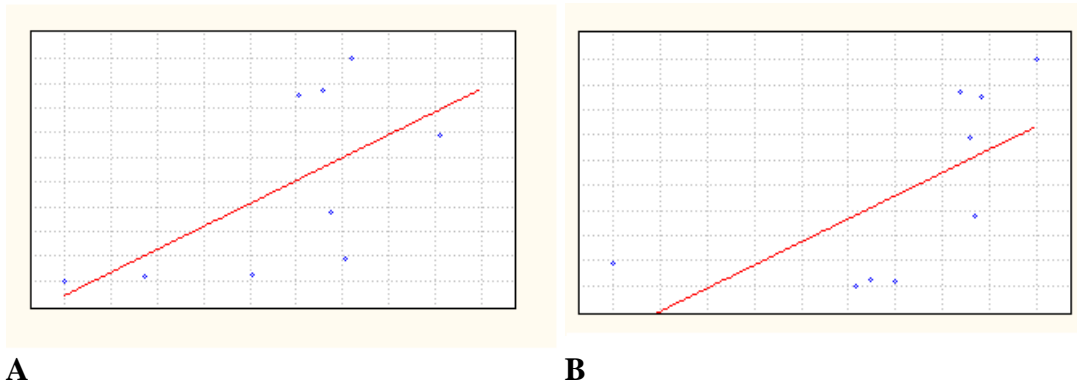
dell'HSF- 1 misurata nel sangue era correlata significativamente con l'ematocrito e con il numero di eritrociti ( $p < 0,05$ ;  $R = 0,68$  e  $R = 0,77$ , rispettivamente), mentre nessuna correlazione è stata individuata per i tre parametri misurati nel liquido amniotico.



**Figura 18.** Concentrazione ematica di HIF-1 $\alpha$  a T0 e T12 nei puledri sani (0) e nei malati (1).



**Figura 19:** (A) correlazione tra HIF-1 $\alpha$  e pCO<sub>2</sub> a T0 ( $R = 0,83$ ) e (B) tra HIF1 $\alpha$  ed MDA a T12 ( $R = -0,72$ )



**Figura 20:** (A) Correlazione a T0 tra HSF-1 ed ematocrito ( $R=0,68$ ) e (B) numero di eritrociti ( $R=0,77$ ).

Parametri ematobiochimici indicatori di funzionalità placentare.

Ottantacinque fattrici sono state utilizzate in questa prova: 61 hanno partorito puledri sani con un parto eutocico e sono state incluse nel Gruppo 1, 24 hanno partorito puledri malati, e sono quindi state incluse nel Gruppo 2. Tutti i puledri sani sono stati dimessi e 6/24 puledri malati sono deceduti. Venticinque/81 placentate hanno presentato alterazioni diffuse rilevabili all'esame macroscopico (20 placentate con ipoplasia dei villi o con peso ridotto, e 10 con presenza di edema o aumento di peso). Nel **Gruppo 1** sono state riscontrate alterazioni macroscopiche della placenta in 13/59 animali, mentre 12/22 placentate del **Gruppo 2** presentavano delle alterazioni.



**Figura 21.** Placentate normali del Gruppo 1 all'esame macroscopico.





**Figura 22.** Placenta con diffusa ipoplasia dei villi e peso ridotto rispetto a quello del puledro (8% del peso del puledro).



**Figura 23.** Puledro affetto da PAS e relativa placenta con ipoplasia diffusa dei villi.



**Figura 24.** Puledro standardbred prematuro e relativa placenta con diffusa area di ipoplasia dei villi nel corpo.



**Figura 25.** Puledro SI dismaturo nato dopo 390 giorni di gestazione. Placenta con ipoplasia dei villi e peso aumentato (6 kg) rispetto al peso del puledro (40 Kg).

L'ipercreatininemia è stata riscontrata in 14/23 puledri del Gruppo 2 e in 7/41 puledri del Gruppo 1, mentre 9/20 placenti patologiche e 9/40 placenti normali sono state associate a un aumento della creatinina. L'ipoglicemia è stata riscontrata in 10/78 puledri, di cui 2/56 puledri sani e 8/22 puledri malati, mentre 6/23 puledri nati da placenti macroscopicamente patologiche e 4/51 nati da placenti macroscopicamente normali hanno presentato una glicemia <40 mg/dl al momento della nascita.

Un aumento della concentrazione di urea, spesso lieve, è stata riscontrata in 6/39 puledri nati da placenti normali e 6/20 nati da placenti patologiche. Si è riscontrato un aumento dell'urea al momento della nascita in 13/63 puledri, di cui 7/40 animali sani e 6/23 animali malati.

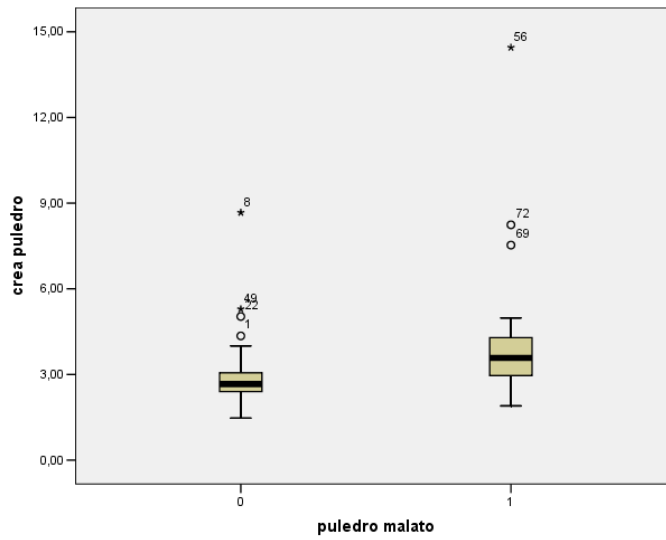
In 4/22 puledri malati e 1/40 puledri sani è stata riscontrata un'iperfibrinogenemia al momento della nascita. Il fibrinogeno è aumentato in 2/20 puledri nati da placenti patologiche e 3/39 nati da placenti macroscopicamente normali.

È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni di creatinina e glucosio al momento della nascita tra puledri sani e malati ( $p < 0.01$ ).

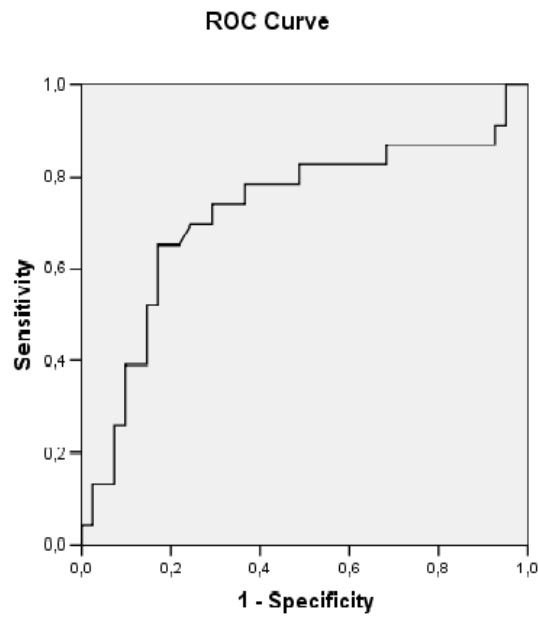
La differenza nelle concentrazioni sieriche di creatinina e glucosio è risultata statisticamente significativa anche tra puledri sopravvissuti e non sopravvissuti ( $p < 0,01$ ), mentre solo la creatinina ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra puledri con placente normali o patologiche all'esame macroscopico ( $p < 0,05$ ).

	Gruppo 1		Gruppo 2		P
	Mediana (25°-75°)	n	Mediana (25°-75°)	n	
Creatinina (mg/dL)	2,67 (2,40 – 3,06)	41	3,58 (2,96 – 4,29)	23	<0,01*
Glucosio (mg/dL)	80,50 (68,50 – 108,50)	56	54,00 (31,00 – 80,00)	22	<0,01*
Urea (mg/dL)	32,75 (26,64 – 38,69)	40	34,58 (30,20 – 40,89)	23	0,12
Fibrinogeno (mg/dL)	2,99 (2,54 – 3,33)	40	3,05 (2,69 - 3,81)	22	0,36

**Tabella 6.** Determinazioni ematobiochimiche effettuate al momento del parto (T0) nei Gruppi 1 e 2. I dati sono espressi come mediana (25°-75° percentile); n=numero di campioni; L'asterisco (\*) indica una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi.



**A**

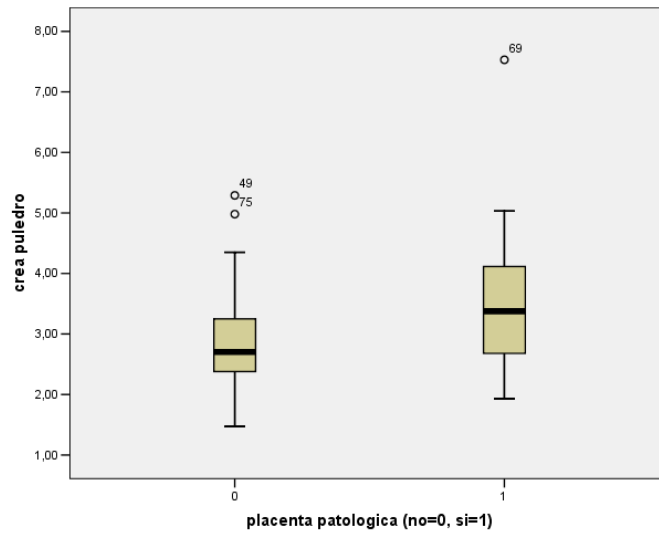


**B**

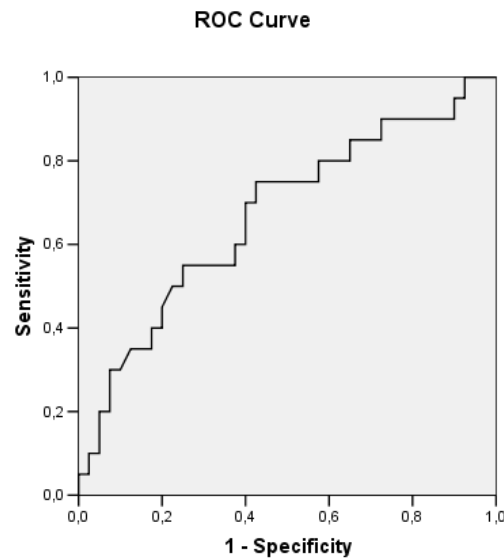
Area (AUC)	S.E.	p	95% Intervallo di confidenza	
			Lower Bound	Upper Bound
0,722	0,072	0,003	0,580	0,864

**Figura 26.** (A) Rappresentazione grafica della differenza nella concentrazione di creatinina tra puledri sani (0) e malati (1) ( $p=0,003$ ); (B) ROC curve e area sotto la curva (AUC).





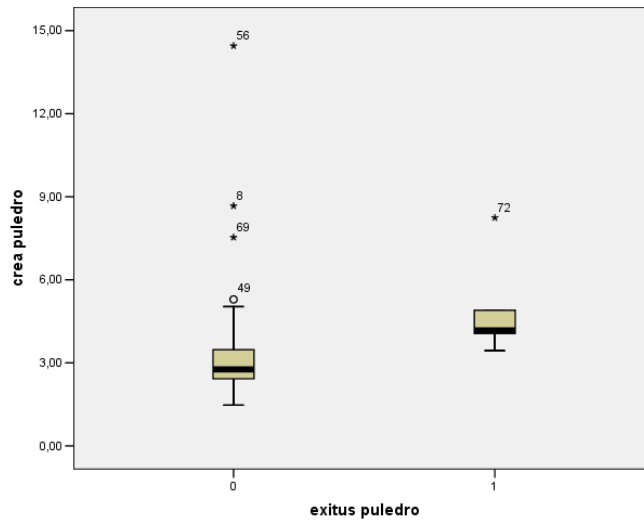
**A**



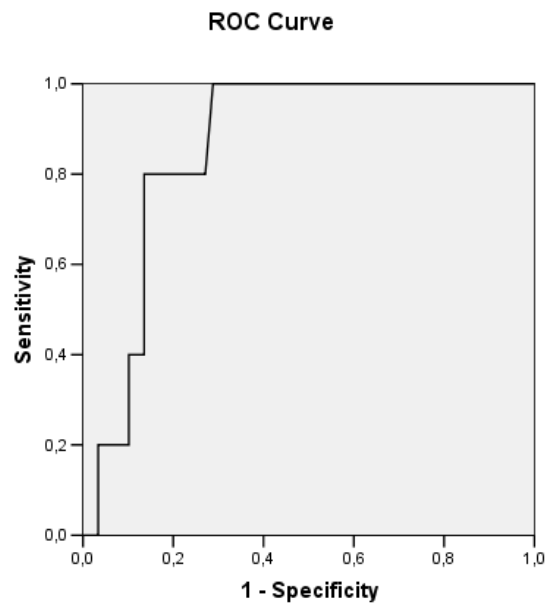
**B**

Area (AUC)	S.E.	p	95% Intervallo di confidenza	
			Lower Bound	Upper Bound
0,670	0,076	0,033	0,522	0,818

**Figura 27.** (A) Rappresentazione grafica della differenza nella concentrazione di creatinina tra puledri nati da placente macroscopicamente normali e da placente patologiche ( $p=0,03$ ), (B) ROC curve e area sotto la curva (AUC).



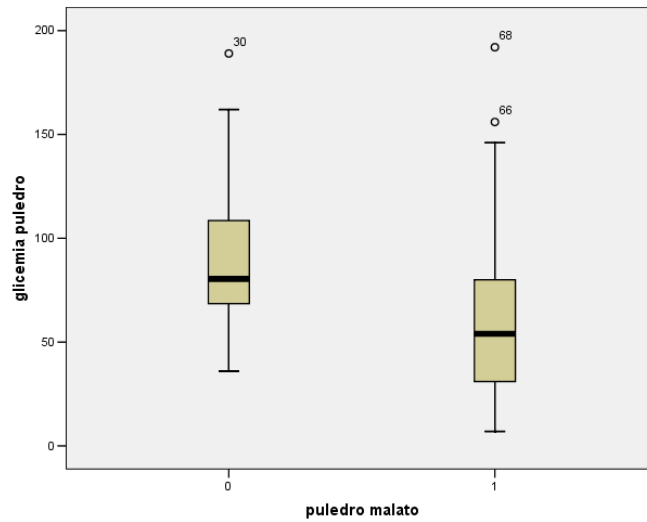
**A**



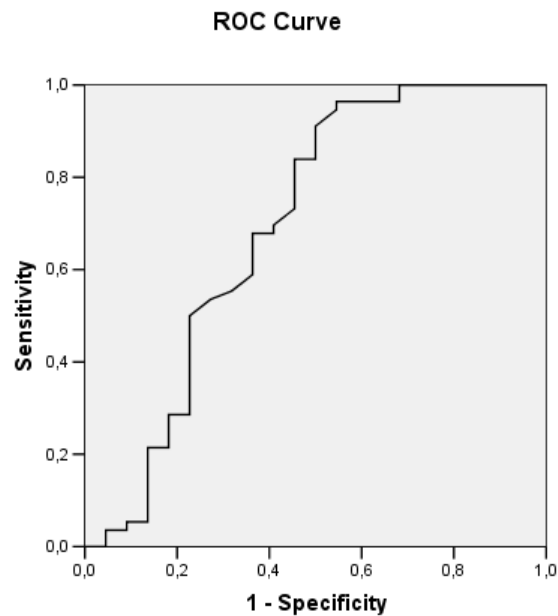
**B**

Area (AUC)	S.E.	p	95% Intervallo di confidenza	
			inferiore	superiore
0,863	0,052	0,007	0,761	0,965

**Figura 28.** (A) Rappresentazione grafica della differenza nella concentrazione di creatinina tra puledri sopravvissuti (0) e non sopravvissuti (1) ( $p=0,007$ ); (B) ROC curve e area sotto la curva (AUC).



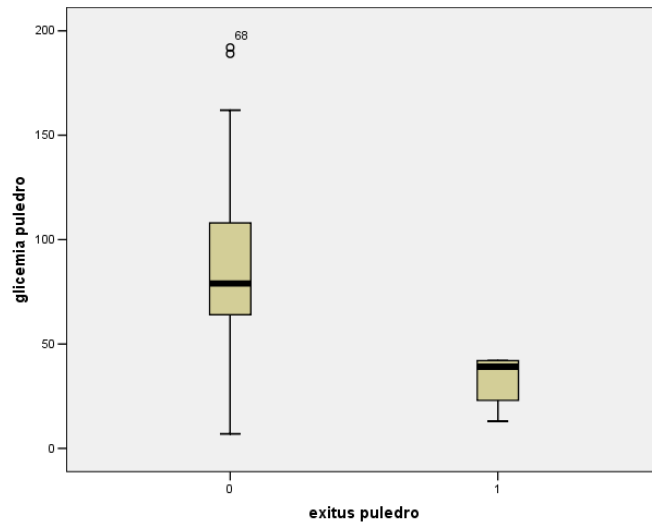
**A**



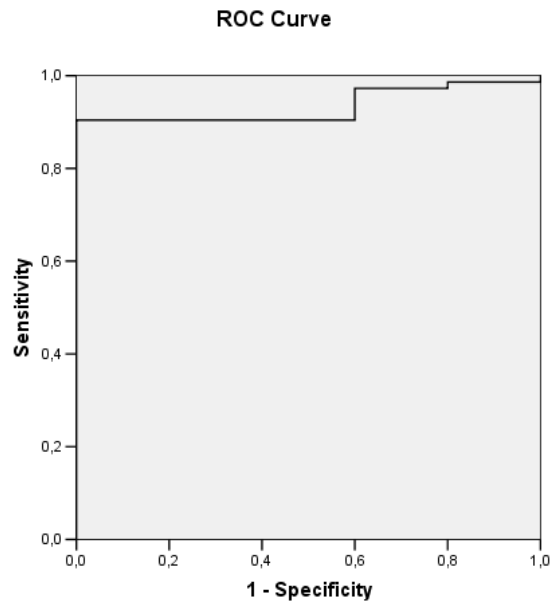
**B**

Area (AUC)	S.E.	p	95% Intervallo di confidenza	
			inferiore	superiore
0,694	0,078	0,008	0,541	0,848

**Figura 29.** (A) Rappresentazione grafica della differenza nella concentrazione di glucosio tra puledri sani (0) e malati (1) ( $p=0,007$ ). (B) ROC curve e area sotto la curva (AUC).



**A**



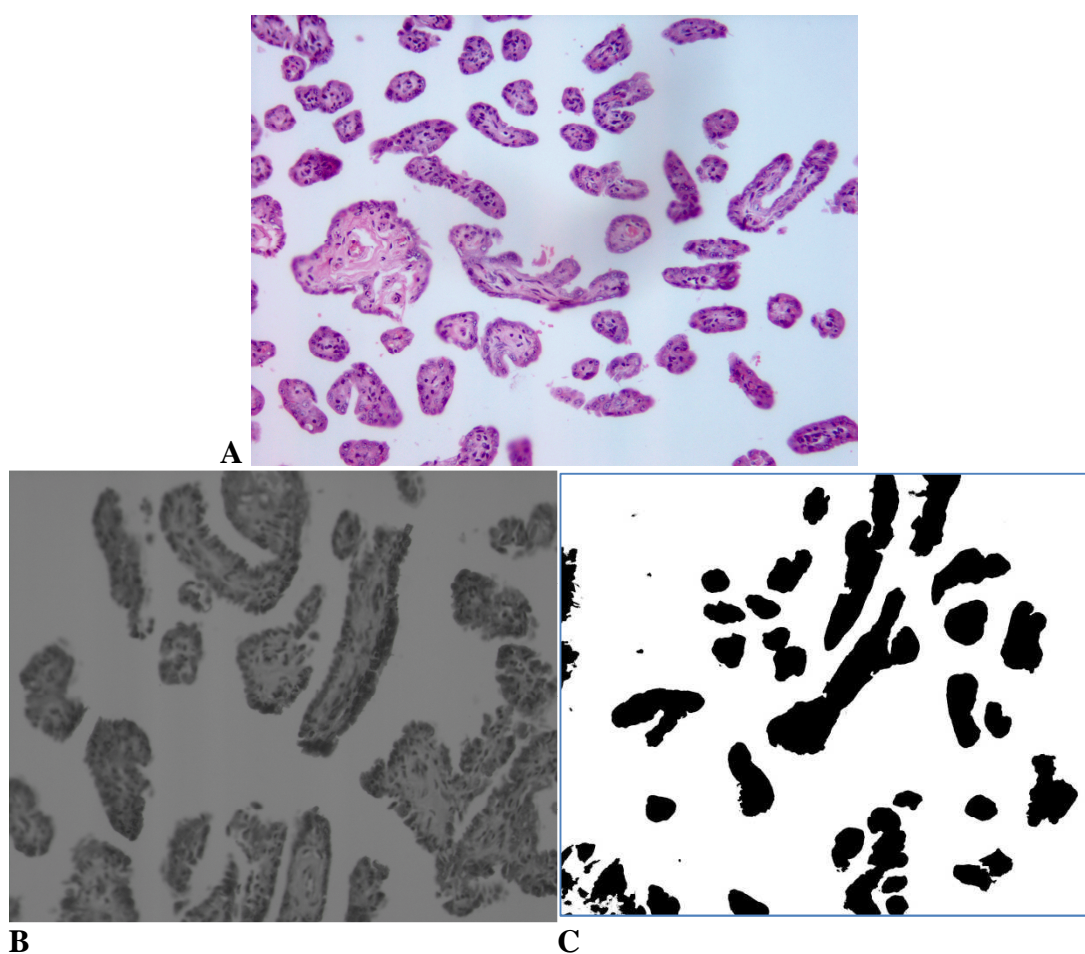
**B**

Area (AUC)	S.E.	p	95% Intervallo di confidenza	
			inferiore	superiore
0,934	0,030	0,001	0,875	0,993

**Figura 30.** (A) Rappresentazione grafica della differenza nella concentrazione di glucosio tra puledri sopravvissuti (0) e non sopravvissuti (1) ( $p=0,001$ ). (B) ROC curve e area sotto la curva (AUC).

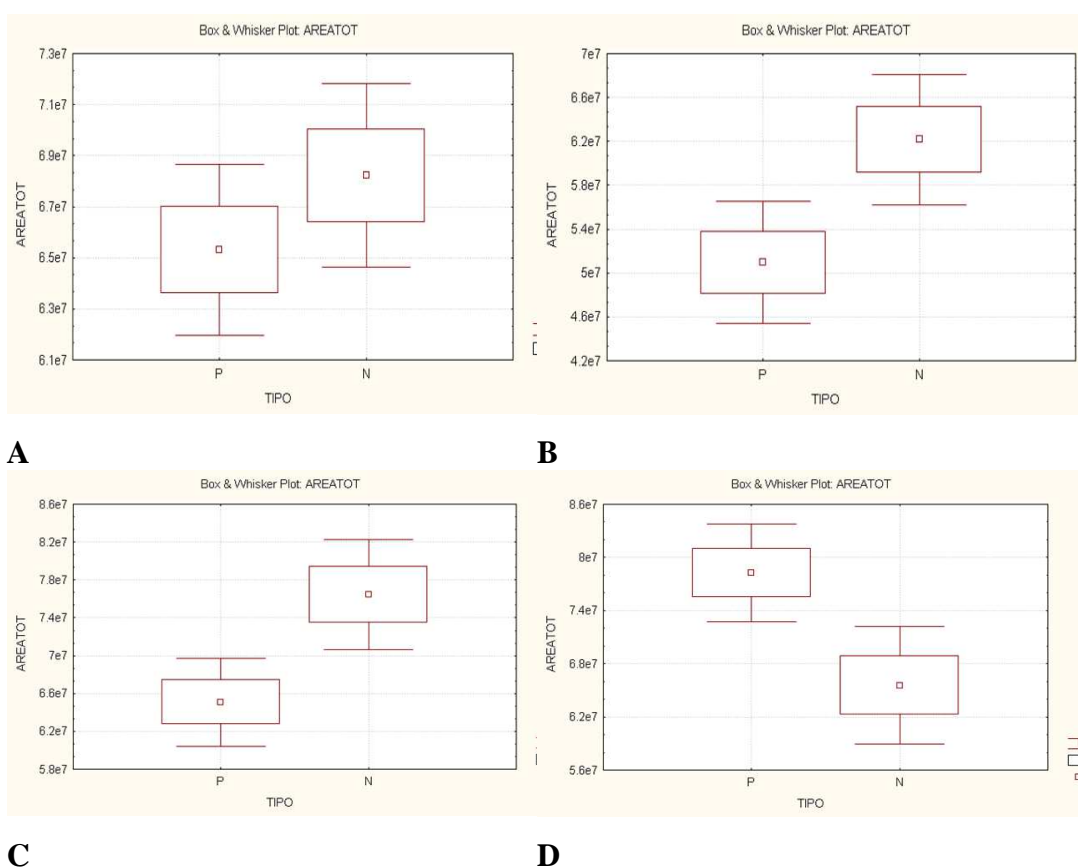
Analisi d'immagine della placenta mediante software imagej.

Nell'ultima prova sono state valutate mediante analisi d'immagine 8 placente di puledri nati da parto eutocico. In particolare sono state confrontate 4 placente di puledri clinicamente sani e 4 placente di puledri malati.



**Figura 31.** Microfotografie dell'arborizzazione basale dei villi ottenute nelle varie fasi di acquisizione dell'immagine. (A) immagine reale dopo colorazione con ematossilina-eosina; (B) acquisizione dell'immagine in bianco e nero mediante software IrfanView; (C) binarizzazione dell'immagine per la valutazione morfometrica mediante software ImageJ.

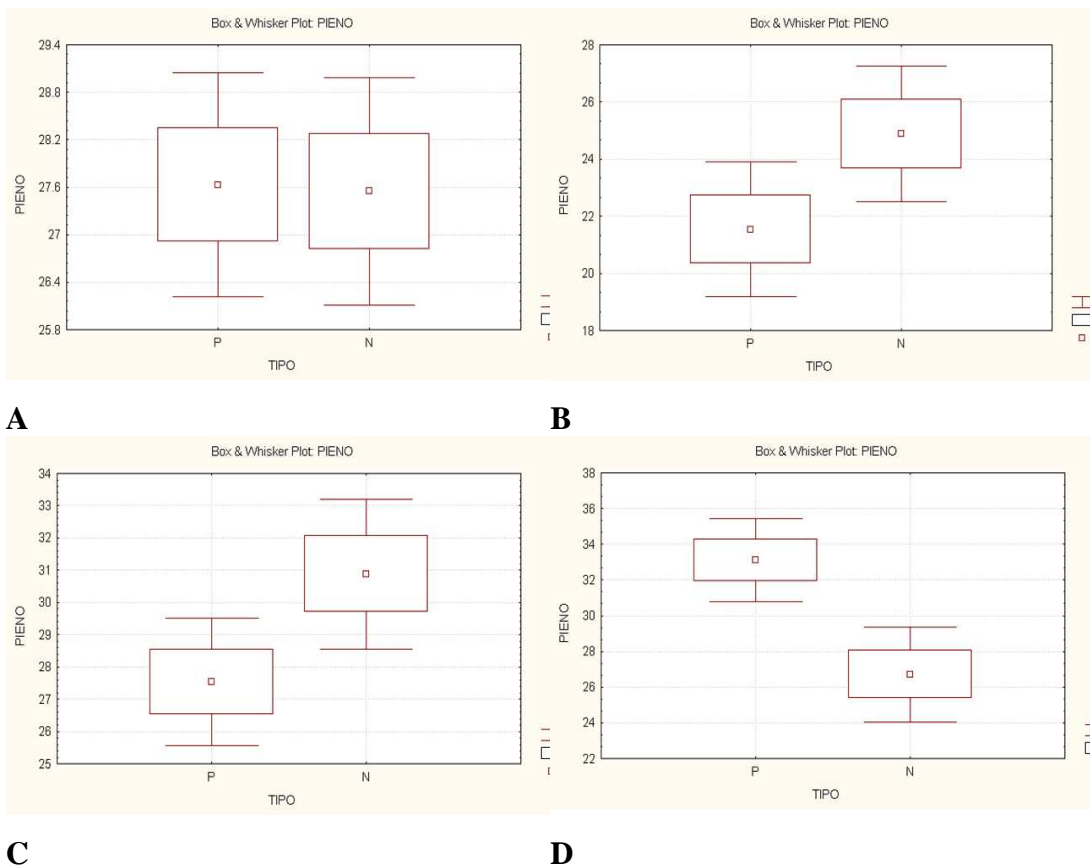
Il primo obiettivo dello studio è stato raggiunto poichè la macro sviluppata per il software ImageJ ha risposto in modo corretto alle fasi di challenge, riconoscendo un campo microscopico totalmente vuoto, un campo totalmente pieno e un cerchio di dimensione nota. Tale prova è stata effettuata con tre computer e tre sistemi operativi differenti, mediante software ImageJ dedicato.



**Figura 32.** rappresentazione grafica della differenza dell'area totale dei villi tra puledri sani (N) e malati (P) misurate in (A) tutti i campioni, (B) nel corpo, (C) nel corno gravido e (D) nel corno non gravido.

La scelta del campo tangenziale ha consentito di ovviare all'inconveniente della non linearità della sezione istologica. Tra tutti i parametri misurati, uno degli aspetti più rilevanti sembra essere l'area

totale dei villi e la percentuale di campo pieno, che possono essere interpretati come misura di sviluppo e trofismo dell'arborizzazione dei villi. L'area totale dei villi e la percentuale di campo pieno sono due parametri predittivi, in quanto risultate significativamente più basse nelle placente patologiche sia nel corpo che nel corno gravido, mentre significativamente più alte nel corno non gravido. L'inversione di tendenza delle misurazioni nel CNG fa risultare il test non significativo confrontando P e N senza distinzione di sede. Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata trovata con i parametri ematobiochimici alla nascita.



**Figura 33.** Rappresentazione grafica della differenza del campo pieno tra puledri sani (N) e malati (P) misurate in (A) tutti i campioni, (B) nel corpo, (C) nel corno gravido e (D) nel corno non gravido.

#### **5.4. DISCUSSIONE**

Lo stato di salute del neonato dipende in larga misura dalle condizioni nelle quali questo si è sviluppato, vale a dire dalle caratteristiche dell'ambiente uterino e soprattutto dall'efficienza della placenta. Il fallimento della placenta nel soddisfare le richieste di ossigeno e substrati, comporta una serie di risposte fetali compensatorie. La comprensione di queste risposte e delle loro manifestazioni cliniche è importante per l'ottimizzazione della gestione clinica e per la valutazione degli interventi terapeutici in questo processo fisiopatologico.

Nella prima prova sperimentale, la concentrazione ematica di lattato è stata valutata in un numero maggiore di puledri sani ( $n = 62$ ) rispetto a studi precedenti presenti in letteratura ( $n=16$ , Magdesian, 2003;  $n=26$ , Castagnetti et al., 2010). I risultati di questa prova sono in accordo con questi studi precedenti, anche se non è possibile confrontare le misure di lattato valutate con strumenti differenti ed in differenti compartimenti ematici.

La concentrazione media della lattatemia dei puledri diminuisce durante le prime 24 ore di vita. L'elevata concentrazione misurata alla nascita, e riportata anche nei neonati umani (Suidan et al., 1984a; Suidan et al., 1984b), potrebbe essere dovuta al rilascio di cortisolo e di catecolamine (Silver et al., 1984; Rossdale et al., 1984; Nordstrom et al., 1996) o all'ipossia fisiologica che si ha durante il processo della nascita. Questo è supportato dalla bassa concentrazione di lattato arterioso del feto equino ( $1,0 \pm 0,20$  mmol/L) misurata da metà gestazione da Fowden et al. (2000a). Al momento della nascita, i puledri malati non presentano una concentrazione ematica di lattato



più alta rispetto ai puledri sani. Questo sottolinea l'importanza dell'età dei puledri in ore quando si interpreta la concentrazione ematica del lattato nei puledri malati, come riportato da Castagnetti et al. (2010). In uno studio sul puledro malato, Henderson et al. (2008) hanno riscontrato che la concentrazione ematica di lattato era diminuita di 0,05 mmol/L per ogni ora trascorsa dal momento del parto al momento del ricovero.

Il monitoraggio della concentrazione di lattato nel sangue ha mostrato una significativa diminuzione tempo-dipendente a T24 sia nei puledri sani che nei malati ( $p < 0,01$ ). Nel Gruppo 2 non è stata valutata la differenza della variazione della concentrazione di lattato nel tempo tra i sopravvissuti e non sopravvissuti, a causa del basso numero di campioni dei puledri non sopravvissuti dopo T0 ( $n = 4$  a T12 e T36,  $n = 2$  a T48 e T72).

Castagnetti et al. (2010) hanno riportato che, nei puledri malati sopravvissuti, la concentrazione ematica di lattato diminuisce durante le prime 24 ore dall'ammissione, mentre nei non sopravvissuti la clearance del lattato non si completa nelle prime 72 ore dal ricovero. Dopo uno studio preliminare (Castagnetti et al., 2009), in questa prova sperimentale la concentrazione di lattato nel liquido amniotico raccolto durante il parto è stata per la prima volta indagata nelle fattrici.

Nella pecora, Brace e Cheung (2005) hanno suggerito un trasporto intramembranoso del lattato sulla base di una correlazione positiva tra la concentrazione di lattato nel liquido amniotico e quello plasmatico fetale.

Nella donna, Wiberg-Itzel et al. (2005) hanno ipotizzato che il lattato venga prodotto nel miometrio e/o nella coriodecidua, e trasferito al

liquido amniotico attraverso le membrane fetali. Inoltre, è stato riportato che, nella donna durante il parto distocico il lattato nel liquido amniotico aumenta a causa di un aumentata produzione da parte delle cellule miometriali, in quanto l'utero si trova in condizioni di ipossia e domina il metabolismo anaerobico (Quenby et al, 2004; Akerud et al., 2009).

In questo studio, non abbiamo valutato statisticamente la differenza della concentrazione di lattato nel liquido amniotico tra cavalle con parto eutocico e distocico, a causa del basso numero di queste ultime. Nella donna, Wiberg-Itzel et al. [33] hanno trovato un concentrazione di lattato amniotico di 8,9 mmol/L (range 6,6-10,8 mmol/L) durante 23 parti eutocici, e di 10,9 mmol/L (range 8,0-16,1 mmol/L) durante 31 distocie.

Anche se in questa prova la concentrazione di lattato amniotico nel Gruppo 2 era positivamente correlata alla durata della fase espulsiva nell'analisi di regressione, il verificarsi di distocia non è risultato statisticamente associato alla concentrazione di lattato nel liquido amniotico, probabilmente anche in questo caso a causa del basso numero di distocie. Questi risultati dovrebbero essere confermati in un maggior numero di fattrici.

Nella donna, il monitoraggio della concentrazione di lattato nel liquido amniotico durante il parto è stato proposto come criterio diagnostico per identificare correttamente la necessità di intervento (Wiberg-itzel et al, 2009; Wiberg-itzel et al., 2010), ma nella fattrice è molto difficile raccogliere il liquido amniotico dopo la rottura del sacco amniotico stesso. Sebbene nel Gruppo 2 la concentrazione di lattato nel liquido amniotico sia correlata alla durata della fase espulsiva, e 7/14 cavalle abbiano avuto un parto distocico, la

concentrazione media di lattato amniotico nel Gruppo 1 (14,99 mmol/L; n = 49) era notevolmente superiore rispetto al Gruppo 2 (12,61 mmol/L; n = 14). Poiché durante la gravidanza, il lattato è fornito al feto dalla produzione e dal trasferimento placentare (Burd et al., 1975; Sparks et al., 1982), si può sostenere che la minore concentrazione di lattato nel Gruppo 2 rispetto al Gruppo 1 potrebbe essere dovuta ad una insufficienza placentare, con una ridotta capacità di soddisfare le necessità metaboliche del feto.

Questa ipotesi è sostenuta dalla correlazione positiva trovata mediante l'analisi di regressione multivariata tra la concentrazione di lattato nel liquido amniotico e la glicemia materna, poichè i tessuti placentari producono lattato dal metabolismo del glucosio (Sparks et al., 1982; Carter et al., 1993; Pere, 1995). Inoltre, la nostra ipotesi è parzialmente supportata dalla correlazione negativa tra la concentrazione di lattato amniotico e il numero di gravidanze delle cavalle; Wilsher e Allen (2003) infatti hanno segnalato che l'età e il numero di gravidanze giocano un ruolo importante nel determinare l'efficienza del contatto materno-fetale nel trasferimento di sostanze nutritive e prodotti di scarto. Inoltre i puledri del Gruppo 2 hanno presentato una minore concentrazione di glucosio nel sangue rispetto a quelli del Gruppo 1, e l'ipoglicemia precedente alla prima poppata è stata associata a insufficienza placentare e PAS (Vaala, 1999).

Infine, la concentrazione di lattato nel liquido amniotico è positivamente correlata al punteggio Apgar ed al pH del puledro, e negativamente correlata al lattato ematico del puledro a T0. Poiché un Apgar basso (Vaala, 2002), un pH basso, ed una elevata concentrazione ematica di lattato sono indicativi di ipossia neonatale

(Borruto et al., 2006), possiamo identificare nella concentrazione di lattato nel liquido amniotico un altro strumento diagnostico di ipossia perinatale.

Nella seconda prova sperimentale è stata evidenziata una diminuzione di HIF-1 $\alpha$  e di HSF1 a 12 ore di vita, che potrebbe indicare il ristabilirsi di una condizione di normossia dopo la nascita e una diminuzione degli eventi stressanti, sia nel puledro sano che in quello affetto da PAS sottoposto a terapia intensiva.

La nascita comporta chiaramente un forte stress ossidativo, per il passaggio dall'ambiente uterino a quello esterno. La valutazione della MDA infatti, maggiore a T0, indica un'iniziale condizione di perossidazione lipidica, dovuta probabilmente ad una produzione massiccia di radicali come conseguenza del burst di ROS prodotti al momento della nascita.

Negli ultimi anni, il coinvolgimento dei mitocondri nella segnalazione di carenza di ossigeno e nella regolazione del HIF-1 $\alpha$  ha ricevuto crescente attenzione, ed attualmente una notevole attenzione è stata posta sul ruolo che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) giocano nella stabilizzazione del HIF-1 $\alpha$ . Dati recenti suggeriscono che la funzione dei mitocondri come sensori di O<sub>2</sub> farebbe aumentare la generazione di ROS in corso di ipossia, dando così inizio ad una cascata di segnali che mediano l'adattamento all'ipossia, e che sono indotti dal HIF-1 $\alpha$  (Chandel e Schumacker, 2000; Michiels et al., 2002). L'ipossia fa quindi aumentare i livelli di ROS mitocondriali, e le cellule carenti di DNA mitocondriale non sono in grado di generare i ROS e non riescono quindi a stabilizzare l'HIF-1 $\alpha$  in corso di ipossia (Chandel et al., 2000).

La differenza significativa nell'espressione dell'HIF-1 $\alpha$  tra animali sani e malati e la correlazione tra HIF-1 $\alpha$  e pCO<sub>2</sub> suggeriscono che anche nel puledro la risposta all'ipossia sia mediata dall'espressione dell'HIF-1 $\alpha$ .

Un'aumentata produzione delle Heat Shock Proteins, la cui produzione è stimolata dall'HSF, è parte della risposta cellulare in caso di bassa tensione di ossigeno nei tessuti dei mammiferi (Morimoto, 1993). Uno studio di Baid et al. (2006) fornisce la prova sperimentale che la regolazione dell'HSF durante l'ipossia richiede sorprendentemente l'attività dell'HIF-1, l'effettore della risposta all'ipossia. Il controllo trascrizionale di HSF da parte dell'HIF-1 ha un impatto funzionale sulla risposta durante l'ipossia e sul ritorno a normali livelli di ossigeno. Nello stesso studio gli autori propongono un modello in cui HIF-1 regola direttamente l'espressione dell'HSF durante l'ipossia, e questo aumento permette a sua volta all'HSF di promuovere la produzione di HSP durante l'esposizione a basse concentrazioni di ossigeno e anche dopo il ritorno a valori di normossia.

La correlazione tra HSF-1, ematocrito e numero di eritrociti alla nascita potrebbe suggerire un'influenza sull'emopoiesi in presenza di ipossia fetale. In letteratura non è stata studiata la possibile influenza di questa proteina sulla trascrizione dell'eritropoietina e la produzione di eritrociti, e sarebbe interessante approfondire l'argomento su un numero maggiore di animali, e valutando l'espressione di specifiche HSP.

L'esame macroscopico di tutta l'unità placentare dopo il parto riveste fondamentale importanza per l'acquisizione di informazioni riguardo al benessere fetale, anche se non sempre ad alterazioni macroscopiche corrispondono alterazioni microscopiche o funzionali.

L'esame istologico potrebbe essere utile per la conferma oggettiva di uno sviluppo anomalo ed una ridotta funzionalità, quale causa di patologia neonatale clinicamente manifesta, ma data la tempistica necessaria per gli esami istologici, il clinico deve avvalersi di strumenti rapidi e di facile interpretazione che possano guidarlo verso interventi terapeutici immediati.

I parametri ematobiochimici rappresentano per questo motivo un utile ausilio. In letteratura non sono presenti studi sulla concentrazione di creatinina nei puledri al momento della nascita, ma un aumento della concentrazione sierica di creatinina nel primo giorno di vita è in genere considerato come il risultato di una disfunzione placentare durante la gestazione (Palmer, 2006).

Sebbene non si conoscano parametri clinico-patologici specifici per la diagnosi di encefalopatia neonatale nei puledri, in uno studio retrospettivo di Bernard et al. (1995) su 78 puledri neonati, nel 32% degli animali si è riscontrato un aumento della concentrazione di creatinina sierica.

La diagnosi più comune per i puledri con ipercreatininemia non associata a disfunzioni renali è l'encefalopatia neonatale (Chaney et al., 2010). Sorprendentemente, in quest'ultimo studio pochi puledri erano nati da fattrici con placentite documentata o patologia placentare. I puledri con ipercreatininemia sono stati confrontati con un piccolo gruppo di puledri con diagnosi di insufficienza renale acuta, e anche se la concentrazione di creatinina al momento

dell'ammissione era simile tra i due gruppi, essa è diminuita più rapidamente nei puledri in cui era assente una patologia renale; ciò è probabilmente legato alla non corretta clearance della creatinina in utero, piuttosto che ad una alterata funzionalità renale.

Il nostro studio conferma l'utilità diagnostica della creatininemia al momento della nascita, che sembra in grado di discriminare tra puledri sani e malati, e tra placenti normali e patologiche.

Un aumento della fibrinogenemia è stato riscontrato solo in 5 animali al momento della nascita. L'iperfibrinogenemia nel puledro neonato indica la presenza di un'infezione e, se presente quando il puledro ha meno di 2 giorni di vita, è altamente indicativa di una infezione in utero (Axon, 2011).

Nel nostro studio, probabilmente a causa del basso numero di puledri con iperfibrinogenemia e di fattrici con placentite, non sono state individuate delle differenze statisticamente significative.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata nella concentrazione dell'urea. L'urea alla nascita infatti presenta valori fisiologici simili a quelli dell'adulto, per poi diminuire nei giorni successivi (Bauer et al., 1984), ed un suo aumento al momento della nascita non deriva dalla clearance placentare, ma da un aumento del catabolismo proteico fetale legato alla carenza di substrati energetici.

L'ipoglicemia alla nascita è risultata statisticamente significativa nel discriminare i puledri sani da quelli malati e come indice prognostico. La concentrazione di glucosio alla nascita è circa il 50% - 60% di quella materna, e raggiunge i valori più bassi 2 ore dopo la nascita (Palmer, 2006).

L'ipoglicemia (<40 mg/dL) nei puledri precedente alla prima poppata è stata associata a insufficienza placentare e PAS (Vaala, 1999), ed è

dovuta alle scarse riserve di glicogeno presenti alla nascita o a una condizione di iperinsulinismo.

Poiché le riserve di glicogeno possono essere ridotte nei neonati prematuri, essi possono sviluppare ipoglicemia se non ricevono un apporto di glucosio dall'esterno. Le riserve di glicogeno sono ridotte anche nei neonati che hanno presentato malnutrizione intrauterina a causa di insufficienza placentare e, se aggravata da asfissia perinatale, ogni riserva di glicogeno viene rapidamente consumata durante la glicolisi anaerobia.

I neonati che presentano deficit di glicogeno possono sviluppare ipoglicemia in qualunque momento nei primi giorni di vita, specialmente se c'è stato un prolungato intervallo tra i pasti o se l'apporto nutritivo è scarso (Axon e Palmer, 2008).

Nella quarta prova sperimentale vengono messi in evidenza sia per l'area totale occupata dai villi che per la percentuale di campo pieno, valori maggiori a livello di corpo e di corno gravido nei sani rispetto ai malati, ma con un'inversione di tendenza nel corno non gravido.

Il corno non gravido è solitamente quello meno sviluppato, ma presenta un denso e folto numero di microcotiledoni; la maggior superficie di scambio è probabilmente data dal corpo della placenta e dal corno gravido, dove in realtà la densità dei microcotiledoni è risultata inferiore.

Non esistono a riguardo dati bibliografici di riferimento, poiché negli studi istologici semiquantitativi e stereologici non si è considerato il contributo di ciascuna regione allo sviluppo totale dell'interfaccia allanto-coriale (Allen et al., 2002; Veronesi et al, 2005).



Questi parametri possono essere considerati dei buoni indicatori del trofismo dell'arborizzazione dei villi, ed è importante sottolineare le differenze morfometriche riscontrate tra animali clinicamente sani e malati.

L'area media dei villi ed il perimetro non possono essere considerati dei parametri predittivi poiché statisticamente non significativi.

I due indicatori di forma (solidità e circolarità) mostrano differenze statisticamente significative, ma la differenza è esigua dal punto di vista biologico; tali valori quantificano mediante l'analisi d'immagine la forma media delle arborizzazioni che è tendenzialmente "rettangolare" (solidità vicina ad 1) e per nulla circolare (circolarità bassa).

La medesima valutazione può essere fatta per il rapporto perimetro/area, essendo un parametro ricavato da misure euclidee. A questo riguardo, sarebbe necessario valutare attraverso parametri non euclidei lo sviluppo placentare. I parametri morfometrici euclidei di descrizione della forma dell'arborizzazione sono in grado di quantificare le forme percepite all'esame istopatologico, ma non di discriminare tra i due gruppi.

## **5.5. CONCLUSIONI**

Nel puledro la diagnosi di ipossia-ischemia al momento della nascita è un fattore critico, e l'associazione di dati clinici e di laboratorio potrebbe risultare utile nell'identificare i puledri con un più alto rischio di sviluppare PAS.

La valutazione della lattatemia è uno strumento semplice ed economico e potenzialmente utile per la diagnosi di acidosi metabolica associata ad ipossia/ischemia, e nel suo complesso l'analisi dei gas ematici costa quasi otto volte più di una singola misurazione del lattato. Infine, i risultati di questa prova hanno sottolineato l'importanza dell'età del puledro in ore quando si interpreta la concentrazione di lattato ematico al momento del ricovero.

La concentrazione di lattato nel liquido amniotico significativamente più alta nelle fattrici che hanno partorito puledri sani è stato un risultato inaspettato e molto interessante, che merita ulteriori indagini con un numero maggiore di animali malati.

Il confronto tra la concentrazione di lattato amniotico in fattrici che hanno partorito puledri malati con parto eutocico e distocico sarebbe utile per valutare la capacità del lattato nel discriminare cause acute e croniche di ipossia fetale.

Sono necessari ulteriori studi per valutare se la concentrazione di lattato nel liquido amniotico, monitorato durante il parto, possa essere utile per identificare la necessità di un intervento repentino, per il monitoraggio del benessere fetale in corso di distocia.

I risultati della seconda prova mettono in luce degli strumenti interessanti per la diagnosi di PAS. Se questi risultati preliminari saranno confermati su un numero maggiore di campioni, i due

marcatori proteici e l'indice di perossidazione potranno essere considerati indici di risposta all'ipossia nel periodo perinatale e potenziali parametri utili per la diagnosi di PAS nel puledro.

L'utilizzo dell'esame placentare, sia macroscopico che microscopico, può portare al riconoscimento di alterazioni morfologiche di base facilmente documentabili e utili per diagnosi di patologie perinatali. Una buona funzionalità della placenta condiziona sia la vita fetale che la vita postnatale ed è, quindi, auspicabile nella pratica ostetrica routinaria una maggiore attenzione all'esame della placenta, soprattutto nelle condizioni di patologia materno-fetale.

L'ausilio di alcuni parametri ematobiochimici (glucosio, creatinina, urea, fibrinogeno) del puledro valutati subito dopo la nascita, potrebbe fornire utili indicazioni riguardo la funzionalità placentare e lo stato di salute del puledro stesso.

Infine, lo sviluppo di una macro per il software ImageJ porta alla luce uno strumento nuovo, semplice da usare ed economico, per la valutazione morfometrica dell'arborizzazione dei villi placentari; tuttavia la ricerca necessita di ulteriori indagini su un numero maggiore di animali per valutare le differenze morfometriche tra placente normali e patologiche.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Abd-Elnaeim M., Leiser R., Allen W.R.: "Structural and haematological aspects of the equine placenta in mid-pregnancy", Proceeding of workshop on Embryonic and Fetal Nutrition, Havemeyer Foundation monograph series n°10, 39-42, Ed. Wilsher S. and Wade J.K., 2003.
2. Adams R.: "The urogenital system", in Koterba A.M., Drummond W.H. e Kosch P.C., eds: "Equine clinical neonatology, Lea&Febiger, Philadelphia, 443-495, 1990.
3. Adams-Brendemuehl C., Pipers F.S.: "Antepartum evaluations of the equine foetus", J Reprod and Fertil, Suppl, 35: 565-573, 1987.
4. Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F., Clement M.G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Guglielmo R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R.: "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia". Seconda Edizione. Casa Editrice Torinese; 28-10125,1998.
5. Akerud H., Ronquist G., Wiberg-Itzel E.: "Lactate distribution in culture medium of human myometrial biopsies incubated under different conditions", Am J Physiol Endocrinol Metab, 297: E1414-1419, 2009.
6. Allen W.R., Stewart F.: "Equine placentation", Reprod & Fertil Develop, 13, 623-634, 2001.
7. Allen W.R., Wilsher S., Turnbull C., Stewart F., Ousey J., Rossdale P.D., Fowden A.L.: "Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero", Reproduction, 123(3): 445-53, 2002.

8. Allen W.R.: "Development and Functions of the Equine Placenta", in Proceedings of a Workshop on the Equine Placenta, Agricultural Experiment Station, University of Kentucky, College of Agriculture, 20-33, 2003.
9. Allen W.R.: "Fetomaternal interaction and influence during equine pregnancy", *J of Reprod and Fertil*, 121, 513-527, 2001.
10. Amoroso E.C. "Placentation" in Marshall's Physiology of Reproduction, Ed: A.S. Parkes, Longmans Green, London, 127-311, 1952.
11. Ansari T., Beech D., Dibbons P.D., Rossdale P.D., Ousey J.C., Chavatte P.: "Pilot investigations into microanatomical defects associated with IUGR in the horse and other domestic animals", *Equine Vet J*, 30: 458-459, 1998.
12. Asbury A.C., LeBlanc M.M.: "The Placenta", in McKinnon A.O. and Voss J. L.: *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, 509-515, 1993.
13. Axon J.E., Palmer J.E.: "Clinical Pathology of the Foal", *Vet Clin Equine*, 24: 357-385, 2008.
14. Axon J.E.: "Critical Care – Assessment", In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., eds, "Equine Reproduction", Wiley-Blackwell, 167-176, 2011.
15. Baird N.A., Turnbull D.W., Johnson E.A.: "Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1", *J Biol Chem* 281(50): 38675-38681, 2006.
16. Balkovetz D.F., Leibach F.H., Mahesh V.B., Ganapathy V.: "A proton gradient is the driving force for uphill transport of lactate

- in human placental brush-border membrane vesicles”, *J Biol Chem*, 263: 13823-13830, 1988.
17. Barone R.: "Anatomia Comparata Dei Mammiferi Domestici" vol 4, Casa Editrice Ed agricole, 1994.
  18. Battaglia F.: "Linking animal studies and clinical studies in IUGR pregnancies", Proceeding of a workshop on Comparative Neonatology/Perinatology, Havemeyer Foundation monograph series n°8, Sibbons P., Foster L., Wade J.F., Eds, 34-37, 2002.
  19. Battaglia F.C., Meschia G.: "Principal Substrates of Fetal Metabolism". *Physiological Reviews*, 58, (2): 499-527, 1978.
  20. Battaglia F.C., Regnault T.R.H.: "Placental transport and metabolism of amino acids", *Placenta*, 22: 145-161, 2001.
  21. Bauer J.E.: "Normal blood chemistry", in Koterba A.M., Drummond W.H. e Kosch P.C., eds: "Equine clinical neonatology", Lea&Febiger, Philadelphia, 602-614, 1990.
  22. Baumann M.U., Deborde S., Illsley N.P.: "Placental glucose transfer and fetal growth", *Endocrine*, 19(1): 13-22, 2002.
  23. Becht J.L. e Semrad S.D. "Hematology, blood typing, and immunology of the neonatal foal". *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1(1): 91-116, 1985.
  24. Bell A.W., Hay W.W., Ehrhardt Jr R.A.: "Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth", *J Reprod Fertil Suppl*, 54: 401-410, 1999.
  25. Bernard W., Reimer J., Cudd T., et al.: "Historical factors, clinicopathologic findings, clinical features, and outcome of neonates presenting with or developing signs of central nervous system disease, Proceedings AAEP convention, 222-224, 1995.

26. Bernard W.V., Reimer J.M.: "Examination of the foal", *Vet Clin North Am Equine Pract*, 10(1): 37-66, 1994.
27. Besedovsky H.O., delRey A.: "Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and Hypotheses". *Endocr Rev.* 17 (1): 64-102, 1996.
28. Borruto F., Comparetto C., Wegher E., Treisser A.: "Screening of foetal distress by assessment of umbilical cord lactate", *Clin Exp Obst & Gyn*, 33(4): 219-22, 2006.
29. Brace RA, Cheung CY. Pre-delivery changes in amniotic fluid volume and composition in sheep. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12(6):396-401.
30. Bracher V., Mathias S., Allen W.R.: "Influence of chorionic degenerative endometritis (endometriosis) on placental development in the mare", *Equine Vet J*, 28: 180-188, 1996.
31. Bucca S.: "Diagnosis of the compromised equine pregnancy", *Vet Clin North Am Equine Pract*, 22(3): 749-761, 2006.
32. Burd L.I., Jones M.D. Jr, Simmons M.A., Makowski E.L., Meschia G., Battaglia F.C.: "Placental production and fetal utilisation of lactate and pyruvate", *Nature*, 254: 710-711, 1975.
33. Byars D.T., Simon B.W.: "Peri-parturient Management of the Mare and Neonate", In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., eds, "Equine Reproduction", Wiley-Blackwell, 111-113, 2011.
34. Carter B.S., Moores R.R. Jr, Battaglia F.C., Meschia G.: "Ovine fetal placental lactate exchange and decarboxylation at midgestation", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 264: E221-225, 1993.

35. Castagnetti C., Mariella J., Pirrone A.: "Monitoring of lactate during the peripartum period in the equine species". Atti VII congresso SIRA, 68-71, luglio 2009.
36. Castagnetti C., Pirrone A., Mariella J., Mari G.: "Venous blood lactate evaluation in equine neonatal intensive care", *Theriogenol*, 73: 343-357, 2010.
37. Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P.T.: "Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing", *J Biol Chem*, 275(33): 25130-25138, 2000.
38. Chandel N.S., Schumacker P.T.: "Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight", *J Appl Physiol*, 88(5): 1880-1889, 2000.
39. Chaney K.P., Holcombe S.J., Schott H.C., Barr B.S.: "Spurious hypercreatininemia: 28 neonatal foals (2000-2008)", *J Vet Emerg Crit Care*, 20(2): 244-249, 2010.
40. Clemmons R.M., Dorsey-Lee M.R., Gorman N.T., Sturtevant F.C.: "Haemostatic mechanisms of the newborn foal: reduced platelet responsiveness". *Equine Vet J*, 16(4):353-6, 1984.
41. Clemmons R.M.: Approach to hemostatic problems" in Koterba A.M., Drummond W.H. e Kosch P.C.: "Equine clinical neonatology, Lea&Febiger, Philadelphia, 28, 615-622, 1990.
42. Collins M.H.: "Placentas and foetal health", *Equine Vet J Suppl*, 14: 8-11, 1993.
43. Comline R.S. e Silver M.: "PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> and pH levels in the umbilical and uterine blood of the mare and ewe". *J Physiol*, 209(3): 587-608, 1970.



44. Corley K.T.T., Donaldson L.L., Furr M.O.: "Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals", *Equine Vet J*, 37: 53-59, 2005.
45. Cottrill C.M.: "Placental evaluation in the field", *Equine Vet Educat*, 3: 204-207, 1991.
46. De Backer D.: "Lactic acidosis", *Intensive Care Med*, 29: 699-702, 2003.
47. Eguiluz A., Bernal A.L., McPherson K., Parrilla J.J., Abad L.: "The use of intrapartum fetal blood lactate measurements for the early diagnosis of fetal distress", *Am J Obstet Gynecol*, 147: 949-954, 1983.
48. Fadel H.E., Northrop G., Misenhimer H.R., Harp R.J.: "Acid-base determinations in amniotic fluid and blood of normal late pregnancy", *Obstet Gynecol*, 53(1): 99-104, 1979.
49. Flood P.F.: "The Placenta of mare: an eclectic overview", *Proceeding of a workshop on the Equine Placenta, Agricultural Experiment Station, University of Kentucky, College of Agriculture*, 16-19, 2003.
50. Fowden A.L., Forhead A.J., White K.L., Taylor P.M.: "Equine uteroplacental metabolism at mid- and late gestation". *Exp. Physiol*, 85(5): 539-545, 2000b.
51. Fowden A.L., Li J., Forehead A.J., Silver M.: "Hormones as nutritional signals during intrauterine development". *Third International Workshop on Equine Perinatology: Comparative Aspects*, *Equine Vet J*, 30: 464, 1998.
52. Fowden A.L., Ousey J.C., Forhead A.J.: "Nutritive and endocrine functions of the equine placenta", *Proceedings of a Workshop on the Equine Placenta, Agricultural Experiment*

- Station, University of Kentucky, college of agriculture, 36-41, 2003.
53. Fowden A.L., Silver M.: "Glucose and oxygen metabolism in the fetal foal during late gestation". *Am J Physiol* 269: 1455–1461, 1995.
54. Fowden A.L., Taylor P.M., White K.L., Forhead A.J.: "Ontogenic and nutritionally induced changes in fetal metabolism in the horse", *J Physiol*, 528(1): 209-219, 2000a.
55. Furr M.O., Lessard P., White N.A.: "Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic", *Vet Surg*, 24:97–101, 1995.
56. Ginther O.J.: "Dynamic physical interaction between the equine embryo and uterus", *Equine vet J*, suppl 3, 41-47, 1985.
57. Gleason C.A., Rudolph C.D., Bristow J., Itskovitz J., Rudolph A.M.: "Lactate uptake by the fetal sheep liver", *J Dev Physiol*, 7: 177–183, 1985.
58. Gravett M.D., Hitti J., Hesse D.L., Eschenbach D.A., Medchill M.T., Prins R.P., Endom J.A., Hobel C., Nicholas M.: "Intrauterine infection and preterm adrenal axis", *Am J Obstet Gynecol*, 182: 1404-1413, 2000.
59. Hafez E. S. E.: "Reproduction in Farm Animals"; Lea & Febiger; Malven, USA; 124-143; 1993.
60. Haluska G.J., Lowe J.E., Currie W.B.: "Electromyographic properties of the myometrium correlated with the endocrinology of the parturition periods and parturition in pony mares", *J Reprod Fertil Suppl*, 35: 553-564, 1987.

61. Harvey RW, Asquith RL, McNulty PK, Kivipelto J., Bauer J.E.:  
“Haematology of foals up to one year old”. *Equine Vet J*, 16(4):  
347–353, 1984.
62. Henderson I.S.F., Franklin R.P., Wilkins P.A., Boston R.C.:  
“Association of hyperlactatemia with age, diagnosis, and  
survival in equine neonates”, *J Vet Emerg Crit Care*, 18(5):  
496–502, 2008.
63. Holzman I.R., Phillips A.F., Battaglia F.C.: “Glucose  
metabolism, lactate, and ammonia production by the human  
placenta in vitro”, *Pediat Res*, 13: 117-20, 1979.
64. Hong C.B., Donahue J.M., Giles R.C., Petrites-Murphy M.B.,  
Poonacha K.B., Roberts A.W., Smith B.J., Tramotin R.R.,  
Tuttle P.A., Swerczek T.W.:” Etiology and pathology of equine  
placentitis”, *J Vet Diagn Invest*, 5:56-63, 1993.
65. Hooper S.B., Walker D.W., Harding R.: “Oxygen, glucose, and  
lactate uptake by fetus and placenta during prolonged  
hypoxemia”, *Am J Physiol*, 268: R303-309, 1995.
66. Inuyama M., Ushigome F., Emoto A., Koyabu N., Satoh S.,  
Tsukimori K., Nakano H., Ohtani H., Sawada Y.:  
“Characteristics of L-lactic acid transport in basal membrane  
vesicles of human placental syncytiotrophoblast”, *Am J Physiol  
Cell Physiol*, 283(3): C822-830, 2002.
67. Jansson T.: “Amino acid transporters in the human placenta”,  
*Pediatric Research*, 49: 141–147, 2001.
68. Jeffcott LB, Rosedale PD, Leadon DP. “Haematological  
changes in the neonatal period of normal and induced premature  
foals”. *J Reprod Fertil Suppl*, 32: 537–544, 1982.

69. Johnston K., Holcombe S.J., Hauptman J.G.: "Plasma lactate as a predictor of colonic viability and survival after 360 degrees volvulus of the ascending colon in horses", *Vet Surg*, 36(6):563-67, 2007.
70. Kenney M.W. "Uterocalin- a provision protein for the equine conceptus?", *Proceeding of a workshop on the Equine Placenta, Agricultural Experiment Station, University of Kentucky, College of Agriculture*, 53-35, 2003.
71. Koterba A.M.: "Prematurity", in Koterba A.M., Drummond W.H. e Kosch P.C., eds: "Equine clinical neonatology, Lea&Febiger, Philadelphia, 55-83, 1990.
72. Kumar A., Ramakrishna S.V.K., Basu S., Rao G.R.K.: "Oxidative stress in perinatal asphyxia", *Pediatr Neurol*, 38: 181-185, 2008.
73. Lackman F., Capewell V., Gagnon R., Richardson B.: "Fetal umbilical cord oxygen values and birth to placental weight ratio in relation to size at birth", *Am J Obstet Gynecol*, 185(3): 674-82, 2001.
74. Lagutchik M.S., Ogilvie G.K., Wingfield W.E., Hackett T.B.: "Lactate Kinetics in veterinary Critical Care: A Review", *J Vet Emerg Crit Care*, 6: 81-95, 1996.
75. LeBlanc M.M., Giguere S., Brauer K., Paccamonti D.L., Horohov D.W., Lester G.D., O'Donnel L.J., Sheerin B.R., Pablo L., Rodgerson D.H.:" Premature delivery in ascending placentitis is associated with increased expression of placental cytokines and allantoic fluid prostaglandins E2 and F2 alpha", *Theriogenology*, 58: 841-844, 2002.

76. Lepage G., Munoz G., Champagne J., Roy C.C.: "Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography", *Anal Biochem*, 197(2): 277-283, 1991.
77. Macpherson M.L., Bailey C.S.: "A clinical approach to managing the mare with placentitis", *Theriogenology*, 70(3): 435-440, 2008.
78. Macpherson M.L.: "Diagnosis and Treatment of Equine Placentitis", *Vet Clin Equine*, 22: 763-776, 2006.
79. Magdesian G.K.: "Blood lactate levels in neonatal foals: normal values and temporal effects in the post-partum period", *J Vet Emerg Crit Care*, 13:174, 2003.
80. Maxwell P.H.: "Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator", *Exp Physiol*, 90(6): 791-797, 2005.
81. Mays M.B.C., LeBlanc M.M., Paccamonti D.: "Route of Fetal infection in a model of ascending placentitis", *Theriogenology*, 58 (2-4): 791-2, 2002.
82. Michiels C., Minet E., Mottet D., Raes M.: "Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes", *Free Radic Biol Med*, 33:1231-1242, 2002.
83. Morimoto R.I.: "Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes", *Science*, 259(5100): 1409-1410, 1993.
84. Morresey P. R. "How to perform a field assessment of the equine placenta", *Proceeding 50th Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 50: 409-414, 2004.
85. Nicolaides K.H., Economides D.L., Soothil P.W.: "Blood gases, pH and lactate in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses", *Am J Obstet Gynecol*, 161: 996-1001, 1989.

86. Nordström L., Achanna S., Naka K., Arulkumaran S.: “Fetal and maternal lactate increase during active second stage labor”, *B J O G*, 108: 263-268, 2001.
87. Nordstrom L., Marcus C., Persson B., Shimojo N., Westgren M.: “Lactate in cord blood and its relationship to pH and catecholamines in spontaneous vaginal delivery”, *Early Hum Dev*, 46: 97–104, 1996.
88. Norton J.L., Dallap B.L., Johnston J.K., Palmer J.E., Sertich P.L., Boston R., Wilkins P.A.: “Retrospective study of dystocia in mares at a referral hospital”, *Equine Vet J*, 39(1): 37-41, 2007.
89. Oulton R.A., Fallon L.H., Meyer H., Zent W.W.: “Observations of the foaling data from two central Kentucky thoroughbred breeding operations during the spring of 2003”, *Proceeding of a Workshop on the Equine Placenta*, Agricultural Experiment Station, University of Kentucky, College of Agriculture, 68-71, 2003.
90. Ousey J. C.: “Hormone profiles and treatments in the late pregnant mare”, *Vet Clin Equine*, 22: 727-747, 2006.
91. Ousey J.C., Beech D.J., Ansari T., Rossdale P.D., Palmer L., Sibbons P.D.: “The effects of intra-uterine disturbances on equine fetal growth and organ development”, *Proceeding of a Workshop on Embryonic and Fetal Nutrition*, Havemeyer Foundation monograph series n°10, Wilsher S., Wade J.F., eds, 72-74, 2003.
92. Palmer J.E.: “Fluid therapy in the neonate: not your mother's fluid space”, *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20(1): 63-75, 2004.

93. Palmer J.E.: "Recognition and resuscitation of the critically ill foal", In: Paradis M.R., (ed), "Equine Neonatal Medicine: A Case-Based Approach", Elsevier Saunders Inc, 135–148, 2006.
94. Pardi G., Marconi A.M., Ceti I.: "Placental-fetal interrelationship in IUGR-fetuses- a review", *Placenta*, 23: 136-144, 2002.
95. Pashen R.L. e Allen W.R.: "The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare". *J Reprod Fert Suppl*, 27:499–509, 1979.
96. Pere M.C.: "Maternal and fetal blood levels of glucose, lactate, fructose, and insulin in the conscious pig", *J Anim Sci*, 73: 2994-2999, 1995.
97. Piquard F., Schaefer A., Dellenbach P., Haberey P.: "Lactate movement in the term human placenta in situ", *Biol Neonate*, 58:61-8, 1990.
98. Poonacha K.B., Donahue J.M., Giles R.C., Hong C. B., Petrites-Murphy M. B., Smith B. J., Swerczek T. W., Tramontin R. R., Tuttle P. A.: "Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas", *Vet Pathol*, 30: 362-369, 1993.
99. Quenby S., Pierce S.J., Brigham S., Wray S.: "Dysfunctional labor and myometrial lactic acidosis", *Obstet Gynecol*, 103: 718-723, 1996.
100. Reece W. "Equilibrio idrico ed escrezione". In: Swenson M.J., Reece W.O., Eds., "Duke's Fisiologia degli animali domestici", Idelson- Gnocchi Sorona, pag: 618-652, 2002.
101. Reef V.B., Vaala W.E., Leila T.W., Spencer P.A., Hammet B.: "Ultrasonographic evaluation of the fetus and

- intrauterine environment in healthy mares during late gestation, *Vet Radiol Ultrasound*; 36: 533-541,1995.
102. Reef V.B., Vaala W.E., Worth L.T., Serthich P.L., Spencer P.A.: "Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of equine biophysical profile", *Equine Vet J*, 28: 200-8,1996.
103. Renaudin C.D., Troedsson M.H.T., Gillis C.L., King V.L., Bodena A.: "Ultrasonic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal Pregnant Mare", *Thriogeneology*, 47: 559-573, 1997.
104. Richter J. e Gotze R.: "Ostetrica veterinaria" Casa Editrice Ambrosiano, Milano, 39, 1994.
105. Rossdale P.D., Ousey J.C., Silver M.: "Studies on equine prematurity 6: Guidelines for assessment of fetal maturity", *Equine Vet J*, 16:300-302, 1984.
106. Rossdale P.D., Ousey J.C.: "Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR", *Equine vet Educ*, 14(2): 98-112, 2002.
107. Rossdale P.D., Ricketts S.W.: "Evaluation of the fetal membranes at foaling", *Equine Vet Education*, 5, 78-82, 2002.
108. Samuel C.A., Allen W.R., Steven D.H.: "Studies on the equine placenta. II. Ultrastructure of the placental barrier". *J Reprod Fert*, 48: 257-264, 1976.
109. Santschi E.M., Vaala W.E.: "Identification of the High-Risk Pregnancy". In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., eds, "Equine Reproduction", Wiley-Blackwell, 5-15, 2011.



110. Schlafer D.H.: "Examination of the placenta", In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., eds, "Equine Reproduction", Wiley-Blackwell, 99-110, 2011.
111. Schlafer D.H.: "The umbilical cord-lifeline to the outside world: structure, function and pathology of the equine umbilical cord", Proceeding of a Workshop on the Equine Placenta, Agricultural Experiment Station, University of Kentucky, College of Agriculture, 92-99, 2003.
112. Sebastian M., Giles R., Roberts J., Poonacha K., Harrison L., Donahue J., Benirs K.: "Funisitis Associated with Leptospiral Abortion in an Equine Placenta" *Vet Pathol*, 42:659-662, 2005.
113. Semenza G. L.: "Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis", *Current Opinion in Genetics & Development*, 8: 588-594, 1998.
114. Settle P., Sibley C.P., Doughty I.M., Johnston T., Glazier J.D., Powell T.L., Jansson T., D'Souza S.W.: "Placental lactate transporter activity and expression in Intrauterine Growth Restriction", *J Soc Gynecol Investig*, 13: 357-63, 2006.
115. Sheerin P.C., Morris S., Kellerman A.: "Diagnostic efficiency of transrectal ultrasonography and plasma progesterin profiles in identifying mares at risk of premature delivery", *Proceedings of the Focus Equine Reproduction Meeting*; 22-23, 2003.
116. Silver M., Ousey J.C., Dudan F.E.: "Studies on equine prematurity 2: Post natal adrenocortical activity in relation to plasma adrenocorticotrophic hormone and catecholamine levels in term and premature foals", *Equine Vet J*, 16:,278-286, 1984.

117. Silver M.: "Some aspects of equine placental exchange and foetal physiology". *Equine Vet J*, 16: 227-233, 1984.
118. Sparks J.W., Hay W.W. Jr, Bonds D., Meschia G., Battaglia F.C.: "Simultaneous measurements of lactate turnover rate and umbilical lactate uptake in the fetal lamb", *J Clin Invest*, 70: 179-92, 1982.
119. Steven D.H., Samuel C.A.: "Anatomy of the placental barrier in the mare" *J of Reprod and Fertil Suppl*, 23, 579-582, 1975.
120. Stewart D.R., Kindahl H., Stabenfeldt G.H., Hughes J.P.: "Concentrations of 15-keto-13, 14-dihydro-prostaglandin F2 alpha in the mare during spontaneous and oxytocin induced foaling. *Equine Vet J* 16(4):270-4, 1984.
121. Suidan J.S., Antoine C., Silverman F., Lustig I.D., Wasserman J.F., Young B.K.: "Human maternal-fetal lactate relationships", *J Perinat Med*, 12(4): 211-217, 1984b
122. Suidan J.S., Wasserman J.F., Young B.K.: "Placental contribution to lactate production by the human fetoplacental unit", *Am J Perinatol*, 1(4): 306-309, 1984a.
123. Tennent-Brown B.S., Wilkins P.A., Lindborg S., Russell G., Boston R.C.: "Sequential plasma lactate concentrations as prognostic indicators in adult equine emergencies", *J Vet Intern Med*, 24(1): 198-205, 2010.
124. Troedsson M., Sage A. M.: "Fetal/ placental evaluation in the mare", *International Veterinary Information Service (www.ivis.org)*, *Recent Advance in Equine Reproduction* , 2001.

125. Troedsson M.: "High risk pregnant mare", *Acta Veterinaria Scandinava*, 49: 1-7, 2007.
126. Troedsson M.H.T., Macpherson M.L.: "Placentitis" in McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. (eds): "Equine Reproduction", second edition, Wiley-Blackwell, 2359-2367, 2011.
127. Vaala W.E., House J.K., Madigan J.E. "Initial management and physical examination of the neonate". In: Smith BP (Ed.), "Large animal internal medicine", Mosby, pp. 277-93, 2002.
128. Vaala W.E., Sertich P.L.: "Management strategies for mares at risk for periparturient complications", *Vet Clin North Am Equine Pract*, 10(1): 237-65, 1994.
129. Vaala W.E.: "Peripartum asphyxia syndrome in foals", *Proceedings of the 45th AAEP Convention*, 247-253, December 1999.
130. Vaala W.E.: "Peripartum asphyxia", *Vet Clin North Am Equine Pract*, 10(1): 187-218, 1994.
131. Veggetti A.: "Corso di embriologia per gli studenti di medicina veterinaria", Esculapio, Bologna, seconda edizione, 1987.
132. Veronesi M.C., Riccaboni P., Faustini M., Battocchio M., Cairoli F., Villani M.: "Potential association between placental features and Apgar score after normal parturition in the thoroughbred horse", *J Anim Vet Adv*, 4(12): 965-970, 2005.
133. Whitwell K.E., Jeffcott L.B.: "Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term", *Research in Vet Science*, 19, 44-55, 1975.

134. Wiberg-Itzel E., Pettersson H., Cnattingius S., Nordström L.: "Association between lactate in vaginal fluid and time to spontaneous onset of labour for women with suspected prelabour rupture of the membranes", *B J O G*, 113: 1426-30, 2006.
135. Wiberg-Itzel E., Pettersson H., Cnattingius S., Nordström L.: "Association between lactate concentration in amniotic fluid and dysfunctional labor", *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87: 924-928, 2008.
136. Wiberg-Itzel E., Pettersson H., Cnattingius S., Nordström L.: "Prediction of time of spontaneous onset of labour with lactate concentration in vaginal fluid in women with suspected preterm prelabour rupture of the membranes", *B J O G*, 116: 62-66, 2009.
137. Wiber-itzel E., Cnattingius S., Nordström L.: "Lactate determination in vaginal fluids: a new method in the diagnosis of prelabour rupture of membranes", *B J O G*, 112: 754-758, 2005.
138. Wiber-itzel E., Pettersson H., Andolf E., Hansson A., Winbladh B., Akerud H.: "Lactate concentration in amniotic fluid: a good predictor of labor outcome", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 152(1): 34-38, 2010.
139. Williams N.M., Donahue J.M., Bolin D.C., Giles R.C., Harrison L.R., Hong C.B., Jackson C.B., Poonacha K.B., Vockers M.L.: "Equine placental pathology: Kentucky perspective", *Proceeding of a Workshop on the Equine Placenta*, Agricultural Experiment Station, 88-92, 2003.

140. Wilsher S., Allen W.R. “The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare”, *Equine Vet J*, 35(5): 476-483, 2003.
141. Wong D., Wilkins P.A., Bain F.T., Brockus C.: “Neonatal encephalopathy in foals”, *Compend Contin Educ Vet*, 33(9): E1-E10, 2011.
142. Wooding F.B.P., Fowden A.L.: “Nutrient transfer across the equine placenta: correlation of structure and function”, *Equine Vet J*, 38: 175–183, 2006.
143. Wooding F.B.P.: “Comparative aspects of placental glucose transporters: is the localization of the equine isoforms unique?”, *Proceedings of a Workshop on Embryonic and Fetal Nutrition*, Havemeyer Foundation monograph series n°10, 61-63, Ed. Wilsher S. and Wade J.F., 2003.
144. Wotman K., Wilkins P.A., Palmer J.E., Boston R.C.: “Association of blood lactate concentration and outcome in foals”, *J Vet Intern Med*, 23: 598-605, 2009.