

Universidad CEU Cardenal Herrera



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Facultad de Veterinaria

Grado de Veterinaria

**CONCENTRACIONES DE AMILOIDE SÉRICO TIPO
A, HAPTOGLOBINA Y PROTEÍNA C REACTIVA Y SU
RELACIÓN CON EL LEUCOGRAMA EN YEGUAS
GESTANTES PURA RAZA ESPAÑOLA**

Santiago Alonso Sousa

Universidad CEU Cardenal Herrera



Facultad de Veterinaria

Grado de Veterinaria

**CONCENTRACIONES DE AMILOIDE SÉRICO TIPO
A, HAPTOGLOBINA Y PROTEÍNA C REACTIVA Y SU
RELACIÓN CON EL LEUCOGRAMA EN YEGUAS
GESTANTES PURA RAZA ESPAÑOLA**

Santiago Alonso Sousa

Tipología tipo B “Trabajo Original”

Moncada, 18 de junio de 2015

Resumen: Las proteínas de fase aguda (PFAs), como el amiloide sérico tipo A (AAS), la haptoglobina (Hp) y la proteína C reactiva (CRP) son marcadores específicos de inflamación, proporcionando un método alternativo de diagnóstico en la monitorización del estado sanitario del caballo. El análisis de dichas proteínas durante la gestación podría ayudar a detectar posibles complicaciones patológicas, establecer un tratamiento y monitorizar la respuesta al mismo. El objetivo de este estudio ha sido determinar las concentraciones séricas de AAS, Hp y CRP junto con el leucograma, para verificar si la gestación fisiológicamente normal manifiesta una respuesta de fase aguda (RFA), y por tanto, evaluar el seguimiento de la misma en yeguas PRE. Las concentraciones de Hp se modificaron significativamente durante la segunda mitad de la gestación, sin modificaciones en el resto de parámetros analizados. En conclusión, la Hp podría ser un marcador útil en el seguimiento de gestaciones fisiológicamente normales en yeguas PRE.

Palabras clave: Gestación. Proteínas de fase aguda. Yegua.

Abstract: Acute phase proteins like serum amyloid A (SAA), haptoglobin (Hp) and C reactive protein (CRP) are specific inflammation biomarkers who can provide a diagnostic alternative system for the healthy state evaluation in the horse. Their analysis of these proteins during the pregnancy could help to detect possible pathologic complications, establish a treatment and evaluate their response. The objective of the current study was determined the serum concentrations of AAS, Hp and CRP and the white blood cells concentration as well trying to verify if the physiological normal pregnancy cause an acute phase response, and therefore, following the pregnancy process in Spanish Purebred mares. Hp concentrations changed significantly during the second half of pregnancy, without changes in the rest of analytic parameters. In conclusion, Hp could be a useful mark in the physiological normal pregnancy evaluation in Spanish Purebred mares.

Keywords: Acute phase proteins. Mare. Pregnancy.

Índice:

Índice de tablas y figuras.....	4
Índice de abreviaturas.....	5
Introducción y objetivos.....	6
Material y métodos.....	11
1. Centro de realización.....	11
2. Animales y manejo.....	11
a. Descripción general de los animales.....	11
b. Condiciones de cría y alimentación.....	12
c. Manejo reproductivo de las yeguas.....	13
3. Obtención y preparación de las muestras sanguíneas.....	13
a. Procedimiento de extracción, manipulación y conservación de las muestras.....	13
4. Análisis laboratorial.....	14
a. Determinación de las proteínas de fase aguda.....	14
b. Determinaciones hematológicas.....	14
5. Análisis estadístico.....	15
Resultados.....	16
a. Concentraciones de AAS, CRP y Hp.....	16
b. Leucograma.....	17
c. Correlaciones entre las PFA y el leucograma.....	18
Discusión.....	19
Conclusión.....	23
Bibliografía.....	23

Índice de tablas y figuras:

Tabla 1: Estadísticos descriptivos de las concentraciones de proteínas de fase aguda en 10 yeguas PRE durante los 11 meses de gestación.

Tabla 2: Media \pm DE de los números absolutos de las distintas poblaciones leucocitarias en 10 yeguas PRE durante los 11 meses de gestación.

Tabla 3: Correlaciones entre las concentraciones de proteínas de fase aguda y las distintas poblaciones leucocitarias.

Figura 1: Valores medios \pm DE de las concentraciones de haptoglobina a lo largo de los 11 meses de gestación en 10 yeguas PRE. (ANOVA; $P < 0,05$).

Índice de abreviaturas:

AAS: amiloide sérico tipo A

AGP: α 1-glicoproteína ácida

BAS: basófilos

Cp: ceruloplasmina

CRP: proteína C Reactiva

DE: desviación estándar

EOS: eosinófilos

Fb: fibrinógeno

Hp: haptoglobina

IL-1: interleucina 1

IL-4: Interleucina 4

IL-5: interleucina 5

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

LEU: leucocitos

LFS: linfocitos

MON: monocitos

NFS: neutrófilos

PFA: proteína de fase aguda

PRE: Pura Raza Español

PSI: Pura Sangre Inglés

RFA: respuesta de fase aguda

TNF- α : factor de necrosis tumoral

VEGF: factor de crecimiento
endotelial vascular

1. Introducción:

La respuesta de fase aguda (RFA) representa un tipo de respuesta íntegra destinada a minimizar el daño, incrementar los procesos de reparación y restaurar la homeostasis tras la lesión tisular. Se trata de un proceso dinámico, inespecífico frente a agentes externos, que implica cambios sistémicos y metabólicos producidos de forma previa a que los mecanismos de la inmunidad específica se pongan en marcha (Gruys *et al.*, 2005). Una de las principales funciones de la RFA es proporcionar energía y sustratos necesarios para la lucha frente a patógenos invasores, evitar la transferencia de metabolitos necesarios y limitar el daño producido por aquellos patógenos y/o eliminar el tejido dañado así como restaurar el tejido sano.

Durante el desarrollo de la RFA se liberan citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), liberados principalmente por los macrófagos (Uhlir and Whitehead, 1999). Estas citocinas son las responsables de la mayoría de los signos específicos de la inflamación (pirexia, leucocitosis, etc) y de la variación en las concentraciones de ciertas proteínas presentes en el plasma denominadas Proteínas de Fase Aguda (PFAs) que incluyen: proteína C reactiva (CRP), amiloide sérico tipo A (AAS), haptoglobina (Hp), fibrinógeno (Fb), ceruloplasmina (Cp) y α_1 -glicoproteína ácida (AGP) (Ceron *et al.*, 2005; Crisman *et al.*, 2008; Eckersall and Bell, 2010).

La RFA sistémica se desarrolla en dos oleadas, la primera de ellas se caracteriza por el incremento de la actividad de fibroblastos y células endoteliales en el lugar de la lesión, y la segunda, definida por la liberación de citocinas, cuya aparición en circulación sistémica es la responsable del amplio rango de efectos inflamatorios sistémicos, así como del incremento de la síntesis hepática de PFAs (Suffredini *et al.*, 1999).

Determinados procesos inflamatorios que no desarrollan síntomas clínicos, como la artritis, también pueden condicionar una RFA (Suffredini *et al.*, 1999). No obstante, aunque estas situaciones generalmente se acompañan de incrementos de PFAs (Jaconsen *et al.*, 2006 a), el aumento es inferior a los episodios de inflamación o infección aguda. Además, existen evidencias científicas de que la respuesta a la inflamación aguda y crónica varía de una proteína a otra (Horadagoda *et al.*, 1994).

La cuantificación individual de PFAs puede proporcionar una valoración de la respuesta al estímulo desencadenante y de esta forma, hacer un seguimiento de la posible patología responsable del estímulo. Cuanto más agresivo sea el estímulo inflamatorio, mayor es el cambio en la concentración de PFAs, de forma que estos valores permanecerán elevados en presencia del estímulo. Si la patología inflamatoria responde al tratamiento, las concentraciones de PFAs regresan a sus valores fisiológicos en días o semanas. Algunos autores, sugieren la necesidad utilizar diversas PFAs en la monitorización del proceso patológico en vez de una sola (Ceron *et al.*, 2008).

Las PFAs se sintetizan principalmente en los hepatocitos como parte de la RFA, aunque se ha reportado también fuentes de síntesis extrahepática (Berg *et al.*, 2011; Lecchi *et al.*, 2012). Se consideran PFAs aquellas proteínas que modifican su concentración plasmática en al menos un 25% en procesos inflamatorios e infecciosos (Eckersall and Bell. 2010). Dichas PFAs se clasifican según dos criterios: el tipo de respuesta cuantitativa ante el estímulo y la función biológica que desempeñan. En base al tipo de respuesta cuantitativa ante el estímulo se diferencian PFAs negativas y positivas. Las PFAs negativas son aquellas proteínas cuyos niveles se ven disminuidos en presencia de una RFA, como la albúmina, prealbúmina y transferrina (Crisman *et al.*, 2008). Las PFAs positivas son las proteínas cuyos niveles se ven incrementados durante la RFA,

sugiriendo la mayor capacidad de síntesis hepatocitaria, que podría estimarse en un 30-40%, aproximadamente (Eckersall and Bell, 2010).

Dentro de las PFAs positivas se consideran dos subtipos en relación al patrón de respuesta a la estimulación, PFAs mayores (o *major*), la más interesante desde el punto de vista clínico en el caballo, está representada por el AAS (Jacobsen and Andersen, 2007), y moderadas o menores (*moderate* o *minor*), representadas por la Hp y la CRP (Jacobsen and Andersen, 2007; Cray, 2011).

Existen diferencias sustanciales entre especies en referencia a la síntesis de PFAs tras la estimulación. Así, mientras que la CRP es la que responde mayoritariamente en el hombre, perro y cerdo, en rumiantes la PFA que responde principalmente al estímulo es la Hp. Una excepción en relación a la especificidad de las PFAs respecto a la especie es el AAS, proteína mayor en todas las especies mamíferas, a excepción de la rata (Uhlir and Whitehead, 1999).

En el caballo, las PFAs sufren un incremento substancial en presencia de procesos patológicos como, infecciones bacterianas y virales (Cohen *et al.*, 2005), cólico, laminitis y artritis experimentalmente inducida, entre otros (Jacobsen *et al.*, 2006 a, b). También se han identificado modificaciones moderadas tras el ejercicio extremo, parto o golpe de calor. Aunque las concentraciones de las diversas PFAs aumentan de forma conjunta, su elevación no es uniforme (Crisman *et al.*, 2008), siendo el AAS la proteína que responde más rápidamente al estímulo en el caballo, alcanzando cifras 1000 veces superiores a los valores de referencia.

La detección del aumento de las PFAs presenta una gran ventaja sobre los métodos de evaluación clásicos de inflamación, ya que tienen una gran estabilidad incluso en congelación (Ceron *et al.*, 2005), y son válidos para el estudio de procesos inflamatorios en situaciones con depleción de médula ósea e inmunosupresión, infecciones virales, etc., ya que la

respuesta leucocitaria es muy variable y no resulta fiable en muchos casos (Jacobsen *et al.*, 2005).

Las PFAs pueden proporcionar un sistema alternativo a la monitorización del estado sanitario en el caballo, ya que las concentraciones de PFAs continúan reflejando la actividad inflamatoria a lo largo del periodo de duración del tratamiento (Jacobsen *et al.*, 2006 b; Lindegaard *et al.*, 2010). A diferencia del examen clínico habitual (examen físico, hematología, bioquímica), los niveles de PFAs no establecen un diagnóstico específico, ya que su elevación no es específica de enfermedad, aunque proporcionan una información objetiva acerca del alcance de las lesiones de forma individual y colectiva. Por lo tanto, la determinación de las PFAs combina la ventaja de los métodos clásicos y la información detallada de la observación clínica, ofreciendo la posibilidad de determinar los patrones proteicos con el tiempo (Jacobsen and Andersen, 2007).

La caracterización de las distintas PFAs en équidos han sido evaluada en presencia de una gran variedad de condiciones patológicas como, infecciones bacterianas (Christoffersen *et al.*, 2008), virus (Hultén *et al.*, 1999), parásitos (Rodríguez *et al.*, 2014), artritis (Jacobsen *et al.*, 2006 a, b), quemaduras (Heegaard *et al.*, 2000), agentes químicos (Heegaard *et al.*, 2000), traumas (Heegaard *et al.*, 2000) cirugías (Jacobsen *et al.*, 2006 c), neoplasias (Heegaard *et al.*, 2000) y patologías inmunomediadas (Gabay and Kushner, 1999). Otra de las causas que condiciona una RFA es el estrés, activando la producción y liberación de PFAs por parte del hígado (Piñeiro *et al.*, 2007).

En el ámbito reproductivo, la bibliografía referente al papel desarrollado por las PFAs durante la gestación es muy escasa y controvertida. En la mujer (Kristensen *et al.*, 2009; Capobianco *et al.*, 2010), y diversas especies animales, como la perra (Ulutas *et al.*, 2009) y la vaca (Krakowski and Zdzisinska, 2007) se ha mostrado que las hormonas esteroideas, como la progesterona (P₄) y los estrógenos pueden modular

la síntesis de citocinas durante el ciclo reproductivo, estableciéndose una relación estrecha entre ambos perfiles durante el ciclo estral y la gestación.

Por otro lado, las investigaciones llevadas a cabo en hembras de diversas especies animales revelaron que la gestación induce leucocitosis (Roy *et al.*, 2010) con neutrofilia (Rebelo *et al.*, 1995), hecho posiblemente relacionado con la liberación de estrógenos, progesterona o cortisol (Awodu *et al.*, 2002). Dicho incremento en el número total de leucocitos se ha relacionado con la liberación de adrenalina, y consecuente movilización de neutrófilos en yeguas Pura Sangre Inglés (PSI) (Gill and Kownacka, 1979) y Bretonas y Brasileñas (Galindo *et al.*, 2007). No obstante, en yeguas Cartujanas, Satué *et al.* (2010) mostraron disminución del número de neutrófilos y eosinófilos en el segundo periodo de gestación. Por el contrario, Plaschka *et al.* (1996) no mostraron modificaciones en el leucograma durante la gestación en yeguas Pura Raza Española (PRE).

Aunque los perfiles de PFAs han sido analizados en determinados procesos patológicos como, endometritis, metritis y placentitis (Christoffersen *et al.*, 2010; Coutinho da Silva *et al.*, 2013; Canisso *et al.*, 2014), la carencia de investigaciones en el campo de la fisiología de la reproducción sobre las PFAs restringe el uso de la evidencia científica en la clínica equina. En la yegua se desconoce la magnitud de la respuesta inflamatoria a la gestación y si dichas proteínas pueden ser utilizadas como fuente de diagnóstico de gestación. Al mismo tiempo, la relación temporal entre ambos perfiles podría justificar la toma de muestras y decisiones clínicas en momentos concretos del ciclo reproductor, excluyendo la presencia de reabsorciones y muerte embrionaria, debido a su implicación en procesos fisiológicos como, nidación embrionaria, desarrollo placentario, etc. que tienen lugar durante este periodo.

El objetivo de este estudio ha sido establecer la relación existente entre las concentraciones de AAS, CRP, Hp y las distintas poblaciones

leucocitarias durante la gestación para verificar al igual que sucede en otras especies si la gestación determina una RFA en la yegua y su magnitud.

2. Material y métodos:

2.1. Centro de realización

El estudio experimental de la presente investigación se llevó a cabo en 6 ganaderías de PRE situadas en el término municipal de Pinedo, Almenara y Massanasa pertenecientes a la Comunidad Valenciana.

Las determinaciones hematológicas se determinaron en el Laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU-Cardenal Herrera. La cuantificación de las distintas fracciones proteicas (AAS, CRP y Hp) se realizó en el laboratorio del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

2.2. Animales y manejo

2.2.1. Descripción general de los animales.

Se ha estudiado un total de 10 yeguas reproductoras sanas PRE elegidas libremente al azar de la totalidad del efectivo reproductor de las citadas ganaderías. En todos los casos los propietarios aceptaron la participación voluntaria en la investigación. La edad de las yeguas al inicio del estudio estuvo comprendida entre los 4 y 17 años.

Los criterios de inclusión de las yeguas para el desarrollo del presente trabajo han sido los siguientes:

- Historial reproductivo: presencia de ciclicidad normal durante las estaciones reproductivas precedentes, ausencia de patologías reproductivas como endometritis, piometra u otros procesos relacionados con pérdidas de fertilidad, así como existencia de partos normales con potros viables.

- Carencia de procesos inflamatorios e infecciosos de cualquier origen o que hubiesen requerido hospitalización un mes antes al inicio de la toma de muestras.
- No haber recibido medicación con antibióticos ni antiinflamatorios durante el periodo de toma de muestras.
- Estar al corriente del programa de desparasitación y vacunación periódicos.

2.2.2. Condiciones de cría y alimentación.

Todos los animales incluidos en este estudio fueron sometidos a condiciones de manejo, alimentación y control reproductivo similares. Una vez alcanzada la edad de 4 años, las yeguas se destinaron a la reproducción, siendo esta la única actividad desarrollada hasta el inicio de la investigación. Durante los periodos de primavera y verano, las yeguas permanecieron estabuladas durante el día, con la finalidad de evitar la exposición a las elevadas temperaturas ambientales, con salidas a la pradera durante la noche. Por el contrario, durante las temporadas de otoño e invierno, salieron al campo durante el día y se estabularon antes del anochecer, debido a las bajas temperaturas de la noche. Las hembras gestantes, desde el momento en que se confirmó la preñez y hasta el inicio del parto, permanecieron sueltas en la pradera.

La alimentación administrada a las yeguas se estableció en función de las necesidades nutritivas, según la edad y el estado reproductivo. Durante el periodo de toma de muestras, las yeguas recibieron una dieta diaria consistente en la combinación de fibra y pienso concentrado. Las cantidades diarias de concentrado en la dieta dividida en dos raciones, fueron de 4 a 6 kilogramos. La fibra la proporcionaron de 2 a 3 kg de heno de alfalfa y paja. El consumo de agua fue *ad libitum*.

2.2.3. Manejo reproductivo de las yeguas.

Desde el comienzo del periodo reproductivo y hasta conseguir que todas las madres quedasen gestantes, las yeguas que mostraban signos de celo se expusieron diariamente a un semental, para comprobar el grado de aceptación del macho o recelado. Aquellas yeguas que se mostraban receptivas al semental se sometieron a un examen ecográfico para verificar el grado de crecimiento folicular, y al mismo tiempo, determinar el momento óptimo de la cubrición. Las yeguas que presentaron diámetros foliculares superiores a 4,0 cm se mandaron a cubrir mediante inseminación artificial, utilizando semen de los propios sementales. La confirmación de la ovulación se realizó a las 48 horas. El diagnóstico de gestación se realizó a los 15 días post-cubrición mediante ecografía transrectal. Posteriormente, se confirmó el mantenimiento de la gestación a los 2 meses. El parto en todas las yeguas ocurrió de forma natural, los potros nacidos fueron viables y no hubo incidencias a resaltar durante el periodo post-parto.

2.3. Obtención y preparación de las muestras sanguíneas

2.3.1. Procedimiento de extracción, manipulación y conservación de las muestras.

Para la realización del presente estudio se extrajeron muestras de sangre venosa a las 10 yeguas que componen el efectivo analizado, durante los 11 meses de gestación, con intervalos entre toma de muestras de 30 días. La colección de sangre se efectuó mediante punción en la vena yugular externa, previa desinfección del área interesada con alcohol, utilizando jeringas desechables con cono luer (*Discardit® II Becton Dickinson*) de 20 ml y agujas de 40 mm de longitud y de calibre 18-20 G (*Sterican®, Braun Melsungen AG*).

Para minimizar las variaciones asociadas al momento del día, la toma de muestra se realizó siempre durante la mañana, entre las 8:00 y las 11:00 horas.

De cada una de las extracciones se obtuvo un total de 20 ml de sangre venosa, que fueron introducidas en tubos de vidrio con activadores de la coagulación y gránulos PS para desuerado (*Tapval*®). Las muestras fueron protegidas de la luz y refrigeradas a 4°C durante su recogida y posterior transporte al laboratorio. En el laboratorio, fueron centrifugadas (*Centrífuga P Selecta*®) a 3.500 rpm durante 10 minutos, para la obtención de suero. Tras la centrifugación, se transvasó el suero a tubos Eppendorf mediante pipetas Pasteur. Las muestras permanecieron almacenadas a -20°C para su análisis posterior.

2.4. Análisis laboratorial.

2.4.1. Determinación de las proteínas de fase aguda.

Para la determinación del amiloide sérico tipo A (AAS; mg/l) se utilizó un método automatizado inmunoturbidimétrico adaptado a un Cobas Mira plus. El nombre del kit utilizado es: LZ test SAA, Eiken Chemical Co (*Eiken SAA TIA*).

Las concentraciones de haptoglobina (Hp; g/l) se analizaron mediante un kit comercial Phase Haptoglobin® (*Tridelta Development Limited, Irlanda*). La lectura se llevó a cabo mediante un lector ELISA de placas.

La proteína C reactiva (CRP; mg/l) fue determinada mediante un método automatizado inmunoturbidimétrico adaptado a un Cobas Mira plus. El kit utilizado para dicha determinación fue CRP Randox.

2.4.2. Determinaciones hematológicas.

Las determinaciones analíticas hematológicas se realizaron mediante un contador celular semiautomático (*IDEXX ProCyte DX*®), con el que se cuantificaron los siguientes parámetros:

- Recuento total de leucocitos (LEU, $10^3/\mu\text{l}$)

- En las extensiones sanguíneas, se llevó a cabo el recuento diferencial de las diversas células sanguíneas: linfocitos (LFS), neutrófilos (NFS), eosinófilos (EOS), monocitos (MON) y basófilos (BAS), sobre un total de 100 células. A partir de los porcentajes obtenidos, se calculó el número absoluto de cada una de las líneas leucocitarias ($10^3/\mu\text{l}$).

2.5. Análisis estadístico.

Para el estudio estadístico, se utilizó el programa informático *Statistica for Windows 6.0* (*Statistica.StatSoft, Inc.*)

Se obtuvieron los estadísticos descriptivos (media y DE) para la totalidad de las muestras analizadas.

La influencia de la gestación sobre las fracciones proteicas (AAS, Hp y CRP) se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) previa transformación logarítmica de los datos, para cumplir las condiciones de normalidad (*Test de Kolmogorov-Smirnoff*) y homocedasticidad (*Test de Levene*). En aquellos casos en los que este análisis mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas, se aplicó seguidamente un test de *Tukey HSD*. Con este último se determinaron las diferencias entre los distintos periodos del ciclo reproductivo.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de correlación lineal (*Correlación de Pearson*) para analizar la relación existente entre el perfil proteico y las distintas poblaciones leucocitarias. Se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$.

3. Resultados:

3.1. Concentraciones de AAS, CRP y Hp

En la *tabla 1*, se muestran las medias y desviaciones estándar de las concentraciones de AAS (mg/L), CRP (mg/L) y Hp (g/L) durante los 11 meses de gestación.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de proteínas de fase aguda en 10 yeguas PRE durante los 11 meses de gestación.

Mes de gestación	n	AAS (mg/L)	CRP (mg/L)	Hp (g/L)
1	10	0,71 ± 1.58	3,14 ± 1.95	2,97 ± 1.47
2	10	0,93 ± 1.59	7,06 ± 5.99	3,14 ± 1.42
3	10	1,01 ± 1.73	12,24 ± 13.81	3,20 ± 1.40
4	10	2,60 ± 2.09	11,99 ± 11.89	2,95 ± 1.50
5	10	4,95 ± 2.49	11,17 ± 11.09	3,01 ± 1.04
6	10	1,41 ± 1.94	13,12 ± 9.70	2,97 ± 1.09
7	10	2,03 ± 2.82	6,60 ± 4.99	5,27 ± 0.67
8	10	3,84 ± 2.33	5,05 ± 7.00	7,42 ± 0.86
9	10	2,05 ± 1.94	6,87 ± 6.65	9,86 ± 0.78
10	10	3,01 ± 1.38	7,43 ± 7.28	8,37 ± 0.35
11	10	0,00 ± 0.00	3,38 ± 6.47	7,02 ± 1.02

AAS: Amiloide A Sérico; CRP: Proteína C Reactiva; Hp: Haptoglobina; n: Tamaño muestral.

Las concentraciones de AAS y CRP no se modificaron a lo largo de la gestación. Las concentraciones de Hp partieron de un valor inicial de (2,97 ± 1.47 g/L) en el primer mes, incrementando progresiva y significativamente hasta el 9º mes de gestación (9,86 ± 0.78 g/L), descendiendo posteriormente, aunque con valores superiores a los del inicio de la gestación (Figura 1; $P < 0,05$).

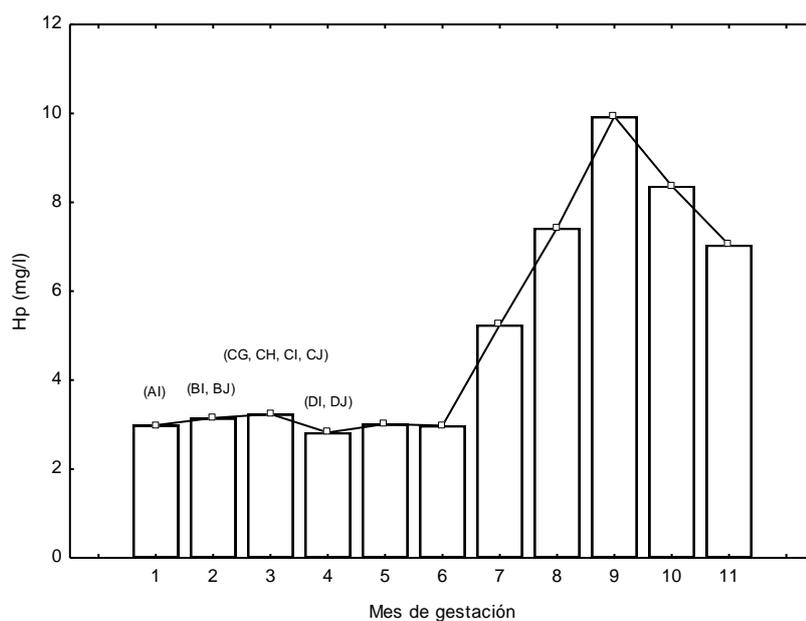


FIGURA 1. Valores medios \pm DE de las concentraciones de haptoglobina a lo largo de los 11 meses de gestación en 10 yeguas PRE. (AI: diferencias significativas entre el primer y noveno mes; BI; diferencias entre el segundo y noveno mes; BJ: diferencias entre el segundo y décimo mes; CG: diferencias entre el tercer y séptimo mes; CH: diferencias entre el tercer y octavo mes; CI: diferencias entre el tercer y noveno mes; CJ: diferencias entre el tercer y décimo mes; DI; diferencias entre el cuarto y noveno mes; DJ; diferencias entre el cuarto y décimo mes) (ANOVA; $P < 0,05$).

3.2. Leucograma

En la *tabla 2*, se muestran las medias \pm DE de los números absolutos de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y basófilos. No se han observado diferencias significativas entre los meses de gestación. A pesar de ello, los valores más elevados se presentaron entre el quinto y el séptimo mes de gestación.

Tabla 2. Media \pm DE de los números absolutos de las distintas poblaciones leucocitarias en 10 yeguas PRE durante los 11 meses de gestación.

MES	N	LEU	LINF	NFS	EOS	MON	BAS
1	10	10,87 \pm 2,88	4,92 \pm 1,27	5,01 \pm 1,52	0,84 \pm 0,56	0,24 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00
2	10	9,82 \pm 1,66	4,02 \pm 1,05	4,98 \pm 1,08	0,62 \pm 0,28	0,22 \pm 0,09	0,00 \pm 0,00
3	10	10,38 \pm 1,77	4,39 \pm 1,23	5,26 \pm 1,00	0,36 \pm 0,23	0,26 \pm 0,20	0,00 \pm 0,00
4	10	10,70 \pm 3,80	4,57 \pm 1,76	5,08 \pm 1,90	0,68 \pm 0,64	0,37 \pm 0,20	0,00 \pm 0,00
5	10	10,39 \pm 1,80	4,41 \pm 1,13	4,95 \pm 0,71	0,71 \pm 0,48	0,32 \pm 0,21	0,00 \pm 0,00
6	10	11,51 \pm 2,89	4,84 \pm 1,31	5,90 \pm 1,56	0,51 \pm 0,35	0,32 \pm 0,18	0,00 \pm 0,00
7	10	11,03 \pm 2,17	4,99 \pm 1,30	5,14 \pm 1,09	0,60 \pm 0,39	0,31 \pm 0,25	0,00 \pm 0,00
8	10	10,68 \pm 2,37	4,62 \pm 1,05	5,38 \pm 1,75	0,42 \pm 0,21	0,25 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00
9	10	10,80 \pm 2,52	4,50 \pm 1,31	5,58 \pm 1,67	0,45 \pm 0,39	0,27 \pm 0,18	0,00 \pm 0,00
10	10	10,75 \pm 2,43	4,41 \pm 1,05	5,53 \pm 1,77	0,60 \pm 0,36	0,20 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00
11	10	10,67 \pm 2,75	4,67 \pm 1,13	5,21 \pm 1,62	0,58 \pm 0,32	0,26 \pm 0,17	0,00 \pm 0,00

LEU: Leucocitos; LINF: Linfocitos; NFS: Neutrófilos; EOS: Eosinófilos; MON: Monocitos; BAS: Basófilos; n: Tamaño muestral. Valores expresados en $10^3/\mu\text{l}$. ($P < 0.05$).

3.3. Correlaciones entre las PFA y el leucograma

En la *tabla 3*, se muestran las correlaciones existentes entre las diversas PFAs y los componentes del leucograma. No se han hallado correlaciones significativas entre ambos grupos de parámetros.

Tabla 3. Correlaciones entre las concentraciones de proteínas de fase aguda y las distintas poblaciones leucocitarias.

	AAS	CRP	Hp	LEU	LINF	NFS	EOS	MON	BAS
SAA	1,00	0,01	-0,09	0,06	0,07	-0,01	0,08	0,27	0,01
CRP		1,00	-0,01	-0,00	0,04	-0,03	0,01	0,02	-0,01
Hp			1,00	0,02	-0,03	0,13	-0,17	-0,11	-0,06
GB				1,00	0,81	0,85	0,54	0,21	0,28
LINF					1,00	0,42	0,47	0,05	0,21
NFS						1,00	0,24	0,23	0,23
EOS							1,00	-0,02	0,29
MON								1,00	-0,10
BAS									1,00

AAS: Amiloide A Sérico; CRP: Proteína C Reactiva; Hp: Haptoglobina; LEU: Leucocitos; LINF: Linfocitos; NFS: Neutrófilos; EOS: Eosinófilos; MON: Monocitos; BAS: Basófilos; ($P < 0,05$).

4. Discusión:

Las concentraciones de AAS no se modificaron a lo largo de la gestación en la yegua PRE, confirmando los resultados de investigaciones precedentes realizadas en la mujer (Ostensen *et al.*, 1985) la perra (Ulutas *et al.*, 2009) y la yegua al final de la gestación (Duggan *et al.*, 2007). No obstante, en mujeres con episodios recurrentes de infección e inflamación uterina, Dabrowsky *et al.* (2009) sugiriendo el papel del AAS como marcador real y sensible de los procesos inflamatorios que ocurren en hembras reproductivas.

Sin embargo, otros estudios realizados en mujeres mostraron elevación de AAS en las gestantes respecto a las ingravidas (Kristensen *et al.*, 2009). De hecho, este aumento llega a ser de 10 a 20 veces superior (208 ng/ml) en el momento del parto, respecto a las medias obtenidas durante el periodo preparto (0,5 mg/dl) (Coutinho da Silva *et al.*, 2013). Se ha sugerido que este incremento está originado por el daño tisular producido en el canal del parto necesario para la expulsión del feto. Por el contrario, estas evidencias no han sido mostradas en todos los estudios (Canisso *et al.*, 2014).

Aunque en la yegua PRE las concentraciones de CRP no han revelado modificaciones a lo largo de la gestación, en la mujer, esta proteína es

sintetizada por el endometrio, sirviendo de mecanismo de defensa innata contra invasores o como agente modulador de la inflamación localizada. Diversos estudios realizados en esta misma especie han mostrado que la CRP se incrementa durante la gestación (Kristensen *et al.*, 2009; Vonversen-Hoeynck *et al.*, 2009), y más concretamente durante el primer trimestre (Belo *et al.*, 2005). Esta respuesta se ha relacionado con la implantación embrionaria (Sacks *et al.*, 2004) o con el incremento progresivo de los niveles de estrógenos (Belo *et al.*, 2005), como también se ha evidenciado en la perra (Kuribayashi *et al.*, 2003). Parece ser que el producto de la concepción es la mayor fuente de síntesis durante las fases tempranas de la gestación (Kasman *et al.*, 1988). No obstante, los niveles de CRP no se mantienen homogéneos en todas las mujeres a lo largo de la preñez, relacionándose con la intensidad del estímulo sobre la liberación de citocinas pro-inflamatorias (Belo *et al.*, 2005), con incremento marcado hacia el momento del parto (Sacks *et al.*, 2004).

En vacas Lee *et al.* (2003) mostraron elevación de CRP durante los cuatro primeros meses de gestación, coincidiendo con los meses de máxima lactación. Dicha elevación podría estar relacionada con los cambios metabólicos y el estrés durante el periodo de intensa producción láctea, ya que durante los últimos dos meses de gestación (período de secado) los niveles se mantuvieron dentro del rango fisiológico.

Por el contrario, en yeguas PSI, Yamashita *et al.* (1991) mostraron disminución progresiva de esta proteína desde el séptimo al noveno mes de gestación, aunque en el momento del parto se elevaron sensiblemente, relacionado con el estrés en el momento del parto.

En la mujer (Cho *et al.*, 2009) y en la vaca (Crisman *et al.*, 2008) la Hp es una de las PFAs más específicas. El papel sobre la reproducción viene dado fundamentalmente por la expresión de dicha proteína en diversos órganos reproductivos como, el ovario (O'Bryan *et al.*, 1997) y el útero (Sharpe-Timms *et al.*, 2000).

Los niveles de Hp en la yegua PRE mostraron un patrón bifásico, en el tercer y noveno mes, este último significativamente más intenso que el anterior. Esta dinámica fue descrita previamente en la mujer (Haram *et al.*, 1983). La Hp ejerce un efecto angiogénico por su acción estimulante de la proliferación y diferenciación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Cid *et al.*, 1993) e inmunosupresor (Oh *et al.*, 1990). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los reguladores clave de la angiogénesis y vasodilatación, que ocurre en la placenta (Espinosa, 2011). La secreción de VEGF es dependiente de determinadas condiciones locales como, la hipoxia (Ferrara, 2004). Se ha demostrado que el trofoblasto se desarrolla bajo condiciones de hipoxia durante al menos el primer trimestre de gestación (Semenza, 2000). Además, la densidad vascular del tejido endometrial se incrementa gradualmente durante toda la gestación (Reynolds and Redmer, 2001). No obstante, la densidad vascular del tejido placentario permanece relativamente constante hasta la mitad de la gestación, incrementándose drásticamente en asociación con el grado de crecimiento fetal (Stegeman, 1974). Este patrón de angiogénesis placentaria favorece el flujo uterino y umbilical durante la gestación (Reynolds *et al.*, 2005).

Por otro lado, los linfocitos T CD4 TH-2, activadores de citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 podrían ser los responsables de la respuesta inmunitaria durante la gestación, ya que concretamente la IL-6 es la precursora de la Hp (Seghal *et al.*, 1989). Dichas citocinas contribuyen a la implantación del embrión, desarrollo placentario y supervivencia fetal (Dealtry *et al.*, 2000)

El mantenimiento de este ambiente inmunitario durante la gestación, es dependiente de otras células productoras de citocinas existentes tanto en el tejido materno como en el fetal. Así, tanto el trofoblasto, los linfocitos granulocitos grandes, las células Natural Killer, los macrófagos y las células estromales a nivel de la decidua contribuyen a mantener este ambiente TH-2 durante el primer trimestre de la gestación. Esta respuesta

adquiere una especial relevancia durante la segunda mitad de la gestación, periodo coincidente con la mayor tasa de crecimiento fetal (Challis *et al.*, 2009). Aunque desconocemos el origen del perfil de esta proteína en la yegua, se podría sugerir mecanismos angiogénicos o inmunitarios similares a la respuesta mostrada por la Hp en otras especies.

Los resultados en la yegua PRE contrastan con los mostrados previamente en la yegua por Taira *et al.*, (1992). De hecho, estos últimos investigadores revelaron incremento de Hp durante los cuatro últimos meses de gestación, alcanzando concentraciones máximas en el momento del parto. Adicionalmente, Canisso *et al.*, (2014) no detectaron modificaciones en el perfil de esta proteína hacia el momento del parto.

En la yegua PRE ni el número de leucocitos totales ni las diversas poblaciones leucocitarias analizadas revelaron diferencias significativas. Estos resultados contrastan con los mostrados en mujeres (Rebelo *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 2010), vacas (Awodu *et al.*, 2002) y yeguas (Gill and Kownacka, 1979; Galindo *et al.*, 2007). De hecho la gestación según estos últimos estudios, se acompaña de leucocitosis, hecho posiblemente relacionado con la dinámica hormonal de los estrógenos, progesterona o cortisol presente durante este periodo. Este incremento de leucocitos totales, porcentaje de linfocitos y número absoluto de neutrófilos llega a cifrarse en un 70% respecto de las yeguas no gestantes (Gill and Kownacka, 1979).

Por el contrario, en yeguas Cartujanas, Satué *et al.*, (2010) mostraron una disminución del número de neutrófilos y eosinófilos en el segundo periodo de gestación, sin modificaciones en los números absolutos de linfocitos, monocitos y basófilos, como previamente verificaron Galindo *et al.* (2007). Finalmente, Plaschka *et al.* (1996) no revelaron modificaciones en el leucograma durante la gestación, hecho que corrobora los resultados de este estudio. Tal vez, el escaso número de animales incluidos en ambos estudios sea la causa de la falta de variaciones entre resultados. Esta

ausencia de modificaciones, según Canisso *et al.*, (2014) podría estar relacionada con los protocolos de muestreo. Además, estos últimos autores mostraron que no hubo un cambio en el leucograma en yeguas con placentitis ascendente experimentalmente inducida.

Según revelan los resultados de este estudio, la gestación en la yegua no manifiesta un patrón de RFA sistémica, a diferencia de lo que acontece en la mujer y la vaca, como se ha expresado anteriormente.

5. Conclusión:

En conclusión, la gestación no modifica las fracciones proteicas de AAS y CRP ni los componentes del leucograma en la yegua PRE. Esta ausencia de variaciones pudiera estar relacionada con el buen estado sanitario de las yeguas presentes en este estudio. Por el contrario, la elevación significativa de Hp en la segunda mitad de la gestación podría sugerir determinados mecanismos fisiológicos no relacionados con el leucograma, por lo que la gestación en la yegua PRE no manifiesta una RFA como en otras especies animales. Estos resultados abren nuevos campos de investigación sobre el papel que desempeña la Hp en la reproducción de yeguas y que por su importancia, deberían ser investigados en futuros estudios.

6. Bibliografía:

Awodu OA, Enosolease ME, Ubaru AG, Famodu AA. Leucocyte count in pregnant Nigerian woman with sickle cell trait. *Afr J Reprod Health* 2002; 6(3): 112-116.

Belo L, Santos-Silva A, Rocha S, Caslake M, Cooney J, Pereira-Leite L *et al.* Fluctuations in C-reactive protein concentration and neutrophil

activation during normal human pregnancy. *Europ J Obst Gynecol Reprod Biol* 2005; 123: 46-51.

Berg LC, Thomsen PD, Andersen PH, Jensen HE, Jacobsen S. Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 155-159.

Canisso IF, Ball BA, Cray C, Williams NM, Scoggin KE, Davolli GM et al. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72: 376-385.

Capobianco G, de Muro P, Cherchi GM, Formato M, Lepedda AJ, Cigliano A et al. Plasma levels of C-reactive protein, leptin and glycosaminoglycans during spontaneous menstrual cycle: differences between ovulatory and anovulatory cycles. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 20.

Ceron JJ, Eckersall PD, Martynez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 2005; 34(2): 85-99.

Ceron JJ, Martynez-Subiela S, Ohno K, Caldin M. A 7-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Vet J* 2008; 177: 6-7.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and Pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16: 206-215.

Christoffersen M, Baagoe CD, Jacobsen S, et al. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 138(1-2): 95-105.

Christoffersen M, Baagore C, Bojesen AM, Jacobsen S, Lehn-Jensen H. Inflammatory markers in serum during induced endometritis in the mare.

In: Proceedings of 10th Annual Congress of the European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP) and the 8th Biennial Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP), European Society of Veterinary Clinical Pathology. CAB Abstracts, Barcelona (Spain) 2008; 189-190.

Cho JK, Kim YH, Park IY, Shin JC, Oh MK, Park SJ et al. Polymorphism of haptoglobin in patients with premature rupture of membrane. *Yonsei Med J* 2009; 50(1): 132-136.

Cid MC, Grant DS, Hoffman GS, Auerbach R, Fauci AS, Kleinman HK. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* 1993; 91(3): 977-985.

Cohen ND, Chaffin MK, Vandenplas ML, Edwards RF, Nevill M, Moore JN, Martens RJ. Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J* 2005; 37(3): 212-216.

Coutinho da Silva MA, Canisso IF, Macpherson ML, Johnson AE, Divers TJ. Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet J* 2013; 45: 619-624.

Cray C. Acute phase proteins in animals. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011; 105: 113-50.

Crisman MV, Scarratt WK, Zimmerman KL. Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin Equine* 2008; 24: 285-297.

Dabrowski R, Kostro K, Lisiecka U, Szczubiał M, Krakowski L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology* 2009; 72(4): 471-476.

Dealtry G, O'Farrel MK, Fernandez N. The Th2 Cytokine Environment of the Placenta. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(2): 107-19.

Duggan VE, Holyoak GR, MacAllister CG, Confer AW. Influence of induction of parturition on the neonatal acute phase response in foals. *Theriogenology* 2007; 67: 372-381.

Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010; 185: 23-7.

Espinosa CR. Angiogénesis placentaria. *Rev vet* 2011; 22(2): 131-138.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.

Gabay C, Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-454.

Galindo CA, Braga C, De Freitas FH, De Oliveira JV, Corerea J. Hematological values and total protein of Brasileiro de Hipismo and Breton mares during pregnancy. *Sci Rural* 2007; 37(6): 1695-1700.

Gill J, Kownacka M. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in pregnant mares of thoroughbred horses. *Bull Acad Pol Sci Biol* 1979; 27(2): 143-148.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6 (11): 1045-1056.

Haram K, Augensen K, Elsayed S. Serum protein pattern in normal pregnancy with special reference to acute-phase reactants. *Br J Obstet Gynaecol* 1983; 90(2): 139-145.

Heegaard PM; Godson DL, Toussaint MJ, Tjornehoj K, Larsen LE, Viuff B, Ronsholt L. The acute phase response haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 77: 151-159.

Horadagoga A, Eckersall PD, Hodgson JC, Gibbs HA, Moon GM. Immediate responses in serum TNF-alfa and acute phase protein

concentrations to infection with *Pausterella haemolytica* A1 in calves. *Res Vet Sci* 1994; 57: 129-132.

Hultén C, Sandgren B, Skiöldebrand E, Kligeborn B, Marhaug G, Forsberg M. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine Influenza Virus infection. *Acta Vet Scand* 1999; 40: 323-333.

Jacobsen S, Andersen PH. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet Educ* 2007; 19(1): 38-46.

Jacobsen S, Niewold TA, Kornalijnslijper E, et al. Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104(1-2): 21-31.

Jacobsen S, Niewold TA, Thomsen MH, Nanni S, Lindegaard C, Olsen E, Andersen PH. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet Immunol Immunopathol* 2006 (a); 112: 321-322.

Jacobsen S, Thomsen MH, Nanni S. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *Am J Vet Res* 2006 (b); 67: 1738-1742.

Jacobsen S, Kjelgaard-Hansen M, Petersen HH, Jensen AL. Evaluation of commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet J* 2006 (c); 172: 315-319.

Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL. Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Am J Vet Res* 1988; 49(2): 184-187.

Krakowsky L, Zdzisinska B. Selected cytokines and acute phase proteins in heifers during the ovarian cycle course and in different pregnancy periods. *Bull Vet Inst Pulawy* 2007; 51: 31-36.

Kristensen K, Wide-Swensson D, Lindström V, Schimidt C, Grubb A, Strevens H. Serum amyloid A protein and C-reactive protein in normal pregnancy and preclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2009; 67: 275-280.

Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M, Kawato K, Honjyo T, Fukuyama M et al. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* 2003; 52(5): 387-390.

Lecchi C, Dilda F, Sartorelli P, Cecilliani F. Widespread expression of SAA and Hp RNA in bovine tissues after evaluation of suitable reference genes. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 145: 556-562.

Lee WC, Hsiao HC, Wu YL, Lin JH, Lee YP, Fung HP et al. Serum C-reactive protein in dairy herds. *Can J Vet Res* 2003; 67(2): 102-107.

Lindegaard C, Bech-Gleerup KC, Thomsen MH, et al. Anti-inflammatory effect of intra-articular morphine in a model of induced equine arthritis. *Am J Vet Res* 2010; 71(1): 69-75.

O'Bryan M, Grima J, Mruk D, Cheng C. Haptoglobin is a Sertoli cell product in the rat seminiferous epithelium: its purification and regulation. *J Androl* 1997; 18: 637-645.

Oh SK, Pavlotsky N, Tauber AI. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol* 1990; 47(2): 142-148.

Ostensen M, Marhaug G, Husby G. Amyloid-related serum protein (SAA) during and after pregnancy in healthy women and women with rheumatic disease. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* 1985; 93(1): 1-5.

Piñeiro M, Piñeiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell FM, Eckersall PD et al. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J* 2007; 173: 669-674.

Plaschka S, García P, Rivera L, Martin J, Lema L, García A. Parámetros hematológicos y bioquímicos durante la gestación de la yegua de raza española. *Med Vet* 1996; 13(12): 646-654.

Rebelo I, Carvalho-Guerra F, Pereira-Leite L, Quintanilha A. Lactoferrin as a sensitive blood marker of neutrophil activation in normal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 62(2): 189-194.

Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer, DA, Caton JS. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol* 2005; 565: 43-58.

Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001; 64: 1033-1040.

Rodríguez R, Cerón JJ, Riber C, Castejón F, Gómez-Díez M, Serrano-Rodríguez JM, Muñoz A. Acute phase proteins in Andalusian horses infected with *Theileria equi*. *The Veterinary Journal* 2014; 202: 182-183.

Roy S, Roy M, Mishra S. Hematological and biochemical profile during gestation period in Shaiwal cows. *Vet World* 2010; 3(19): 26-28.

Sacks G, Seyani L, Lavery S, Trew G. Maternal C-reactive protein levels are raised at 4 weeks gestation. *Hum Reprod* 2004; 19(4): 1025-1030.

Satué K, Muñoz A, Blanco O. Pregnancy influences the hematological profile of Carthusian broodmares. *Polish J Vet Sci* 2010; 13(2): 393-394.

Sehgal PB, Grieninger G, Tosato G. Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann NY Acad Sci* 1989; 1: 557-583.

Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000; 14: 1983-1991.

Sharpe-Timms KL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM. Differential expression and localization of de-novo synthesized endometriotic haptoglobin in endometrium and endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2000; 15(10): 2180-2185.

Stegeman JH. Placental development in the sheep and its relation to fetal development. *Bijdragen Tot De Dierkunde (Contrib Zool)* 1974; 44: 3-72.

Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Graddy NP. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 1999; 19(4): 203-214.

Taira T, Fujinaga T, Okumura M, Yamashita K, Tsunoda N, Mizuno S. Equine haptoglobin: isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. *J Vet Med Sci* 1992; 54(3): 435-442.

Uhlir CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265: 501-523.

Ulutas PA, Musal B, Kiral F, Bildik A. Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. *Vet Sci* 2009; 86: 373-376.

Vonversen-Hoeynck FM, Hubel CA, Gallaher MJ, Gammill HS, Powers RW. Plasma levels of inflammatory markers neopterin, sialic acid, and C-reactive protein in pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens* 2009; 22(6): 687-692.

Yamashita K, Fujinaga T, Okumura M, Takiguchi M, Tsunoda N, Mizuno S. Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. *J Vet Med Sci* 1991; 53(6): 1019-1024.