

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS DA GESTAÇÃO INICIAL E
RECONHECIMENTO MATERNO DA PREENHEZ NA ÉGUA**

VANESSA CANAL

**PORTO ALEGRE
2015/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS DA GESTAÇÃO INICIAL E
RECONHECIMENTO MATERNO DA PREENHEZ NA ÉGUA**

VANESSA CANAL

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Co-orientador: Frederico Lança
Schmitt

Trabalho apresentado à Faculdade
de Veterinária como requisito
parcial para a obtenção da
Graduação em Medicina
Veterinária

**PORTO ALEGRE
2015/1**

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Aléssio e minha mãe Jacinta por nunca terem medido esforços para que eu realizasse meu sonho de ser uma Médica Veterinária, pela confiança depositada em mim não apenas nesses 5 anos e meio, mas sim ao longo de uma vida e por terem sido sempre exemplos de força e perseverança, os quais tentei seguir para me tornar a pessoa que sou hoje. Às minhas irmãs, Leonice e Eliane, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e companheirismo de todos os dias e por serem essas pessoas maravilhosas. À minha avó, Rosalina, minhas madrinhas e padrinhos, meus tios, tias, primos e primas por terem participado desse momento, uns mais próximos, outros mais distantes, formando essa família maravilhosa. Sou imensamente agradecida à Deus por tê-los em minha vida.

Ao meu namorado Gabriel Santos pelo apoio, amor e companheirismo nesse tempo que estamos juntos. Obrigada por tornar meus dias mais felizes, por estar ao meu lado em todos os momentos e por dividir comigo teu conhecimento.

Às minhas “amigas (os) barbosenses” de infância e também os que a vida me presenteou com o passar dos anos, pela compreensão e carinho de sempre, por se fazerem presentes mesmo distantes fisicamente e por estarem dispostos a ajudar sempre que precisei.

Às amigas (os) que fiz em Porto Alegre, as quais tornaram a cidade mais colorida e a saudade de casa menos dolorosa, em especial Thai, Dai, Nati Schmidt, Carol e Luiza. Obrigada pela companhia de sempre, pelo ombro amigo nos dias tristes, pelas indiadas, caronas e festas, enfim, por tudo. Meu muito obrigada, vocês foram o maior presente que a veterinária poderia ter me dado.

Ana, Carol e Lilian, pela amizade, carinho, por serem as melhores colegas de apartamento e por encherem ele de vida, tornando-o um lugar maravilhoso de se viver.

Ao meu orientador de monografia e demais trabalhos ao longo desses três anos de estágio no REPROLAB, Prof. Rodrigo Costa Mattos, pelo exemplo de profissional e ser humano e por todo o conhecimento passado.

Ao co-orientador Frederico Lança Schmitt, pela orientação nessa monografia, mas muito mais por todos os ensinamentos nesses anos de estágio, pelas oportunidades de aprendizado, pela paciência e exemplo de competência.

À todos os veterinários que dividiram comigo seu conhecimento, pelas oportunidades de estágio e por terem contribuído com a minha formação como veterinária: Fernando Gonzales, Andreia Keller, Elizabeth Caldas Soares, Roberto Veloso, Vanessa Brucker e Reno Roldi de Araujo.

E por fim, quero agradecer à todos os colegas do REPROLAB e do Hospital Veterinário Jockey, por todos esses anos de trabalho em equipe, pelo bom convívio, pelas oportunidades de aprendizado e pelo conhecimento dividido, aos Amigos que fiz nesses dois lugares, Giovani, Henrique, Malu, Ana, Mica, Eliana, Eduardo, Daniel, Luciana, Bianca, Tamarini, Anita, Nicolas, Matheus, Vinícius, Marcelo, Thais, Gilberto, Rômulo, Mariana, Bartira e Ederson pela amizade e carinho de sempre, e por terem sido verdadeiros irmãos durante esses anos.

“A amizade é uma dádiva de Deus...Mais tarde, haveremos de sentir falta daqueles que não nos deixam experimentar solidão”

RESUMO

As taxas de perda embrionária precoce são altas na espécie equina durante o período de peri-implantação. Estima-se que 16 a 17% das gestações diagnosticadas no 15º dia são perdidas, sendo a maioria delas, entre os dias 15 e 35. Portanto, o conhecimento dos eventos biológicos e moleculares associados a este período da gestação em éguas são de extrema importância econômica, e por isso a necessidade de estudá-los. Muitos aspectos do início da gestação na égua mostram-se únicos desta espécie e têm importante significado prático na medicina veterinária. A interação entre o embrião e o ambiente uterino é fundamental para que o desenvolvimento embrionário precoce, a implantação e a manutenção da gestação ocorram de maneira adequada. Quando chega no útero, o embrião indica sua presença e interrompe a continuação do ciclo estral, promovendo a manutenção da gestação, em um processo chamado de reconhecimento materno da prenhez. Em suínos e ruminantes, esse sinal derivado do embrião que inibe a luteólise mantendo a gestação já é conhecido, ao contrário da espécie equina.

Palavras-chave: perda embrionária, égua, desenvolvimento embrionário, implantação, ciclo estral, luteólise, reconhecimento materno da prenhez.

ABSTRACT

Early embryonic loss rates are high in the equine species during the peri-implantation period. It is estimated that 16-17% of the pregnancies diagnosed on the day 15 are lost, most of these, between day 15 and 35. Therefore, knowledge of the biological and molecular events associated with this period of pregnancy in mares is of great economic importance and so the need to study them. Many aspects of early pregnancy in the mare are unique of this species and have important significance in veterinary medicine. The interaction between the embryo and the uterine environment is fundamental so that early embryonic development, deployment and maintenance of pregnancy occur properly. When it arrives in the uterus, the embryo indicates its presence and stops the continuation of the estrous cycle, promoting the maintenance of pregnancy, in a process called maternal recognition of pregnancy. In pigs and ruminants, this signal derived from the embryo that inhibit luteolysis maintaining the pregnancy is known, on the contrary of the equine species.

Keywords: *embryonic loss, mare, embryonic development, deployment, estrous cycle, luteolysis, maternal recognition of pregnancy.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microscopia eletrônica de varredura do endométrio de éguas em diestro (D7, 10, 13) e éguas prenhes (P7, 10. 13).....	21
----------	--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

% - por cento

D - dias

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PGF_{2-α} - Prostaglandina F_{2-α}

P₄ - Progesterona

E₂ - Estradiol

μm - micrômetros

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

LH - Hormônio Luteinizante

IGF-1 - Fator de Crescimento Insulínico tipo 1

mg - miligrama

mm - milímetro

Da - Dalton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	CARACTERÍSTICAS DA GESTAÇÃO INICIAL NA ÉGUA.....	11
2.1	Fecundação.....	11
2.2	Desenvolvimento Embrionário Inicial.....	12
2.3	Transporte para o Útero.....	14
2.4	Cápsula.....	14
2.5	Nutrição.....	16
2.6	Mobilidade.....	16
2.7	Fixação.....	17
2.8	Cálices Endometriais.....	17
3	RECONHECIMENTO MATERNO DA PRENHEZ.....	19
3.1	Manutenção do Corpo Lúteo.....	19
3.2	Alterações Endometriais.....	20
3.2.1	Histologia.....	20
3.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	21
3.2.3	Vascularização.....	21
3.3	Proteínas do Fluido Endometrial.....	22
3.3.1	Uterocalina.....	22
3.3.2	Osteopontina.....	23
3.4	Hormônios e Receptores.....	23
3.4.1	Progesterona.....	23
3.4.2	Estrógenos.....	24
3.4.3	Ocitocina.....	26
3.4.4	Prostaglandina.....	28
3.5	Interferon.....	29
3.6	Fator Antiluteolítico.....	29
4	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

O mercado da equinocultura movimenta cerca de 7,5 bilhões de reais/ano no Brasil, gerando aproximadamente 2,6 milhões de empregos indiretos e 650 mil diretos, representando seis vezes a quantidade gerada pela indústria automotiva, sendo, portanto, uma atividade importante para o país, tanto econômica quanto socialmente. O Brasil é o terceiro maior rebanho do mundo, com aproximadamente 8 milhões de animais (MAPA, 2015).

Altas taxas de perda embrionária precoce ocorrem na égua durante o período próximo a implantação, principalmente em éguas subférteis, com problemas relacionados a idade ou alterações degenerativas no endométrio (ALLEN et al., 2007; MORRIS; ALLEN, 2002). Estima-se que 16 a 17 % das gestações equinas diagnosticadas no 15º dia são perdidas, sendo a maioria delas entre os dias 15 e 35 (MORRIS; ALLEN, 2002). Portanto, a gestação inicial na égua é um período crítico e de extrema importância econômica, por isso a necessidade de se estudar os eventos biológicos e moleculares associados à esse período (HAYES et al., 2012).

A interação entre o embrião e o ambiente uterino é fundamental para que o desenvolvimento embrionário inicial, a implantação e a manutenção da gestação ocorram de maneira adequada (KLEIN; TROEDSSON, 2011a). Ao chegar no útero, o embrião indica sua presença, interrompe a continuação do ciclo estral, mantendo a gestação em um processo denominado reconhecimento materno da prenhez (SHORT, 1969).

Em algumas espécies, como ruminantes e suínos, esse processo já é conhecido, ao contrário da espécie equina, cujo sinal derivado do embrião responsável por esse reconhecimento materno ainda não foi identificado (KLOHONATZ; BOUMA; BRUENMER, 2013).

2 CARACTERÍSTICAS DA GESTAÇÃO INICIAL NA ÉGUA

A espécie equina apresenta particularidades em relação ao desenvolvimento morfológico do embrião, à origem dos anexos fetais, à junção feto - maternal, à formação dos cálices endometriais e à mobilidade embrionária. Muitos aspectos do início da gestação na égua mostram-se únicos desta espécie e têm importante significado prático na medicina veterinária (ALLEN, 2000), sendo as interações materno-embrionárias iniciais fundamentais no êxito da gestação (KLEIN; TROEDSSON, 2011a).

2.1 Fecundação

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do oócito pelo espermatozoide (GINTHER, 1992), que ocorre no oviduto. Para que isso ocorra é necessária a migração espermática entre as células do *cumulus*, a união da cabeça do espermatozoide à zona pelúcida e posteriormente a penetração espermática por uma abertura através da zona pelúcida atingindo a membrana vitelínica e resultando na fusão dos gametas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Para serem capazes de fecundar, os espermatozoides passam por várias modificações sequenciais incluindo a maturação, capacitação e a reação do acrossoma. A capacitação desencadeia a reação acrossomal, que promove a liberação de enzimas hidrolíticas, como, hialuronidase e acrosina necessárias para a penetração no oócito (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A união da cabeça espermática à zona pelúcida se estabelece pela ligação à receptores espermáticos específicos na sua superfície, ZP 1, ZP 2 e ZP 3, presentes em todas as espécies de mamíferos. As ZP 1 e ZP 2 são glicoproteínas estruturais, enquanto a ZP 3 age como receptor espermático (HERRLER; BEIER, 2000).

A região equatorial da cabeça do espermatozoide liga-se à membrana vitelínica provocando a retomada da segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar (GINTHER, 1992). Os dois pró-núcleos migram para o centro do ovo, os envelopes nucleares se rompem e fundem-se, formando a primeira célula do conceito, o zigoto.

Após a fecundação ocorrem modificações na superfície do oócito que impedem a fusão de outro espermatozoide, inibindo a polispermia (HERRLER; BEIER, 2000).

2.2 Desenvolvimento Embrionário Inicial

O primeiro mês de gestação é extremamente importante na reprodução equina, pois o embrião, desde o início, participa de um "diálogo" com a égua promovendo o estabelecimento de um ambiente favorável para que a gestação possa continuar (FLEMING et al., 2004).

Depois do estágio de zigoto, os embriões sofrem uma série de divisões mitóticas. A primeira clivagem do embrião equino ocorre 24 horas após a fecundação (HERRLER; BEIER, 2000). Esta clivagem se dá por divisão vertical e as células resultantes são denominadas blastômeros. Até o estágio de oito células, estes formam um arranjo frouxo e após a terceira clivagem começam a se aglomerar formando uma massa esférica compacta.

Por volta de quatro a cinco dias após a fecundação, o embrião apresenta-se com 16 a 32 células (GINTHER, 1992), sendo denominado de mórula a partir dos 16 blastômeros (HERRLER; BEIER, 2000). A chegada do embrião no útero, ocorre no D 6 – 6,5 no estágio de mórula tardia ou blastocisto inicial (ALLEN, 2000).

A blastocele é formada pelo acúmulo de fluido no interior da cavidade central, sendo o conceito neste estágio denominado blastocisto inicial (GINTHER, 1992). Segundo Ginther (1992), nesta fase as células do embrião se diferenciam em trofoblasto e embrioblasto. O trofoblasto ou ectoderma, que é originado da camada celular externa, possui função de captação de nutrientes e dará origem à porção embrionária da placenta (córion), responsável pela implantação do embrião na parede uterina. Já o embrioblasto, que é originado da massa celular interna, se projeta para o interior da blastocele e originará o embrião propriamente dito.

Por volta do sexto ao sétimo dia, começa, entre a zona pelúcida e o trofoblasto, a formação da cápsula, uma fina camada transparente e acelular, exclusiva do embrião equino e que possui importantes funções na manutenção da viabilidade embrionária até aproximadamente os 21 dias quando desaparece (BETTERIDGE, 1989).

Células endodérmicas originadas do botão embrionário começam a circundar a cavidade blastocística - segundo folheto germinativo - e completando-a por volta dos 12 dias (GINTHER, 1992), resultando em uma membrana contínua, que irá compor o saco vitelínico. Esta estrutura é predominante nos equinos nas primeiras três ou quatro semanas de gestação, participando do suprimento nutricional inicial do embrião (SHARP, 2000).

A terceira camada, a mesoderme, que originará vasos sanguíneos e tecidos conjuntivos, começa surgir a partir do botão embrionário, entre o trofoblasto e endoderme próximo aos 14 dias (SHARP, 2000) e o saco vitelínico aumenta seu tamanho.

Segundo Ginther (1998), o crescimento no diâmetro do concepto é extremamente rápido nos D 11 – D 16, estágio no qual atinge um platô.

Até os 16 - 17 dias, o embrião equino migra por todo útero, sinalizando sua presença e inibindo a luteólise, processo imprescindível para manutenção da gestação. No dia da fixação a vesícula ainda possui formato esférico e o mesoderma avascular continua projetando-se pela parede do saco vitelínico. A formação de vasos sanguíneos próximos ao botão embrionário, o mesoderma vascular, também ocorre nessa idade (GINTHER, 1992). O exoceloma é uma cavidade formada entre os folhetos vascular e avascular do mesoderma, próximo ao botão embrionário. Também nesta fase, o trofoblasto e mesoderma, começam a passar sobre o botão embrionário, marcando o início da formação do âmnion.

Aos 18 dias, o saco vitelínico apresenta duas porções: uma com três folhetos embrionários e vasos sanguíneos, ventralmente, onde se encontra o embrião; e outra constituída de dois folhetos, dorsalmente (GINTHER, 1992). A cavidade amniótica é resultante da passagem do trofoblasto e mesoderma, denominado de córion, sobre o botão embrionário.

O líquido amniótico é formado pelas secreções das paredes ou folhetos amnióticos, pela saliva, secreção nasal e temporariamente pela urina do feto. Flutuando neste líquido, o embrião fica protegido da desidratação e de choques mecânicos (GINTHER, 1992).

A vesícula nesta fase não se mostra mais esférica como anteriormente, isso acontece devido a um espessamento da parede uterina do lado que ocorre a adesão miometrial à vesícula, mas ela volta ao seu formato nos dias subquentes, quando uma substância que inibe tônus uterino é liberada (GASTAL et al., 1998a).

O saco amniótico está completamente formado aos 21 dias e o saco alantoideano emerge em direção ao exoceloma a partir do intestino posterior do disco embrionário, se tornando proeminente aos 24 dias (GINTHER, 1992). Aos 24 dias também é visualizada, pela primeira vez, a união do córion com o alantóide, que dará início a formação da placenta.

Durante os dias 30 - 36, o saco alantoideano aumenta e faz com que o embrião suba em direção ao polo oposto. O líquido alantoideano é de origem renal, geralmente composto por urina fetal (GINTHER, 1992). É na porção da mesoderme avascular, localizada entre o saco vitelínico e alantóide, que células se organizarão para formar a cinta coriônica que posteriormente darão origem aos cálices endometriais (LUNN; VAGNONI; GINTHER, 1997).

Os vasos sanguíneos se desenvolvem na mesoderme da porção alantoideana e irrigam o alantocórion e o corioâmnion.

No dia 40, fim do estágio embrionário e início do fetal, o embrião envolto pelo âmnion já foi movido para o polo oposto e o saco vitelínico desaparece, sendo sua função desempenhada pela placenta. Devido ao crescimento do saco alantóide, as membranas que o separavam do saco vitelínico se encontram dorsais à vesícula, fazendo com que o cordão umbilical seja anexado dorsalmente ao útero (GINTHER, 1992).

2.3 Transporte para o Útero

O transporte de embriões e oócitos do oviduto para o útero é diferente na espécie equina em relação a outros mamíferos (ALLEN, 2001). Os oócitos não fertilizados ou embriões não viáveis, ficam retidos nas dobras da mucosa do oviduto e posteriormente são degenerados (FLOOD; JONG; BETTERIDGE, 1979). Lavados de tubas uterinas de éguas *post mortem* demonstram muitos óocitos degenerados de ovulações de ciclos anteriores, onde não ocorreu fertilização (BETTERIDGE; MITCHELL, 1974).

Por outro lado, se ocorrer a fertilização do oócito gerando um embrião, este atravessa a junção útero-tubárica chegando no útero D 6 – 6,5 após ovulação no estágio de mórula tardia ou blastocisto inicial (ALLEN, 2000).

Assim que atinge o estágio de mórula compacta, por volta dos cinco dias após ovulação, o embrião começa secretar grande quantidade de prostaglandina E₂ (PGE₂) (GINTHER, 1992; ALLEN, 2000; BETTERIDGE, 2000), provocando contrações locais e relaxamento da musculatura lisa da parede do oviduto que juntamente com o batimento ciliar rítmico, permitem que o embrião se mova, entrando no útero após 24 horas aproximadamente (GASTAL et al., 1998b).

O tempo de permanência do embrião equino no oviduto é considerado prolongado quando comparado ao de outras espécies, como suínos (48 horas) e ruminantes (72 horas) (ALLEN, 2000), no entanto, este período é necessário para permitir a proliferação do epitélio glandular para posteriormente secretar o histotrofo (GERSTENBERG; ALLEN; STEWART, 1999).

2.4 Cápsula

A cápsula é uma fina camada transparente e acelular, que começa se formar entre a zona pelúcida e o trofoblasto, por volta do sexto a sétimo dia após a ovulação (BETTERIDGE, 1989).

Esta é composta por glicoproteínas semelhantes a mucina produzidas pelo trofoblasto e algumas proteínas produzidas pelo endométrio (BETTERIDGE et al., 1982; GINTHER, 1992; ALLEN, 2001).

As mucinas são uma família de glicoproteínas de alto peso molecular, encontradas cobrindo as superfícies luminais dos órgãos epiteliais na maioria das espécies, sendo o útero um destes. Gillies et al. (1999) demonstraram que o RNAm da MUC 1, uma mucina altamente expressa em humanos e coelhos, se expressa no endométrio de éguas prenhes no décimo primeiro dia de gestação e no de éguas não prenhes no 18º dia do ciclo estral, assim como no trofoblasto de grande parte dos embriões obtidos nesse período. Al-Ramadan et al. (2002) determinaram por imunofluorescência indireta a expressão da MUC 1 no corno gravídico e não gravídico de éguas nos dias 14, 17, 21, 27 e 37 e mostraram que ela se expressa de forma uniforme nas superfícies apicais do epitélio luminal e glandular do útero, porém sua coloração foi mais intensa no corno gravídico que no não gravídico em todos os dias avaliados, com exceção do dia 37 onde foram similares. Foi proposto que esta mucina está envolvida em uma cascata de eventos que levam ao sucesso da fixação e placentação em suínos e ovinos (AL-RAMADAN et al., 2002).

Com a rápida expansão do blastocisto e a diminuição da espessura da zona pelúcida, ocorre a ruptura desta aos oito dias e a cápsula passa a ser o revestimento externo do embrião (BETTERIDGE, 2000; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005).

A manutenção da forma esférica do embrião durante o período de reconhecimento materno é fornecida pela cápsula. Embora fina, é bastante resistente e elástica funcionando como uma proteção física ao conceito durante a fase de migração (ARAR et al., 2007; SHARP, 2000). Devido as altas concentrações de ácido siálico, age como uma molécula anti-adesiva, prevenindo a fixação precoce (SHARP, 2000; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005).

Além disso, fornece proteção contra o estresse mecânico das contrações miométriais (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005) e como uma defesa biológica contra microorganismos ou o ataque imunológico materno.

À medida que o conceito se move pelo interior do útero, a cápsula acumula em sua superfície, uma série de componentes das secreções das glândulas endometriais, sendo importante também no processo de nutrição do embrião (ALLEN, 2001).

Em um estudo avaliando a importância da cápsula para a viabilidade embrionária, Stout, Meadows e Allen (2005) removeram a cápsula de embriões e os transferiram em éguas receptoras, como resultado eles obtiveram que nenhum embrião desprovido de cápsula

desenvolveu a gestação, por outro lado, embriões que não tiveram a cápsula removida desenvolveram normalmente a gestação.

2.5 Nutrição

Durante a fase de mobilidade, o conceito é sustentado inteiramente por secreções exócrinas das glândulas endometriais (LEFRANC; ALLEN, 2007) que se acumulam no lúmen uterino, um fenômeno conhecido como nutrição histotrófica (ASHWORTH, 1995).

Na égua, como a implantação ocorre bem mais tarde que em outras espécies (BAZER et al., 2009), o histotrofo é particularmente importante (REILAS, 2001). Dentre as principais proteínas encontradas no fluido uterino, temos a uteroglobina, uterocalina, uteroferrina (BEIER et al., 1995). A uterocalina (UCA) está envolvida no transporte de lipídios de importância biológica como ácidos graxos poli-insaturados e retinol através da cápsula (CROSSETT et al., 1998).

Klein e Troedsson (2011b) demonstraram que o endométrio e o embrião expressam diversos transportadores de soluto e de nutrientes (genes SLC) regulados de acordo com o estágio de desenvolvimento do conceito. Aos oito dias, os autores verificaram um aumento na expressão de 30 transportadores e uma diminuição de 12, sugerindo que esses transportadores contribuem para as trocas de nutrientes entre o embrião em desenvolvimento e histotrofo secretado pelo útero. Também identificaram um aumento na expressão de cinco apolipoproteínas pelo embrião. Estas são proteínas que se ligam à lipídeos formando lipoproteínas de transporte, que segundo os autores, podem estar envolvidas no transporte de nutrientes lipídicos para o embrião.

2.6 Mobilidade

A mobilidade embrionária é um evento que contribui para a manutenção da gestação, pois acredita-se que durante a migração o conceito secreta uma substância antiluteolítica ou iniba a secreção pulsátil de prostaglandina $F_2\text{-}\alpha$ ($PGF_2\text{-}\alpha$), através da sua interação física com o epitélio endometrial, dessa forma evitando a lise do corpo lúteo (ALLEN, 2005).

Segundo Griffin, Carnevale e Ginther (1993), o embrião chega ao corpo uterino pela primeira vez no oitavo dia, migrando de um corno à outro, cerca de dez a vinte vezes por dia (GINTHER, 1998), terminando sua mobilidade aos 16 dias, quando ocorre a fixação (GINTHER, 1995).

McDowell et al. (1988), estudaram o efeito da restrição embrionária sobre o reconhecimento materno, ligando o útero em diferentes porções e obtiveram 100% de reconhecimento materno nas éguas cujos embriões tiveram maior acesso ao útero (restrição apenas da ponta do corno contralateral à ovulação), 50% naqueles que tiveram um acesso intermediário (corpo e corno uterino ipsilateral à ovulação) e 0% nas éguas cujos embriões ficaram restritos à um pequeno espaço (ponta do corno ipsilateral à ovulação), demonstrando que a mobilidade embrionária é fundamental para o reconhecimento materno da prenhez.

Durante essa fase, o conceito secreta $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ e PGE_2 , possivelmente responsáveis pelo estímulo local para as contrações miométriais que propulsionam o embrião (STOUT; ALLEN, 1996). Segundo estudos de Stout e Allen (2001a), a administração sistêmica de flunixin meglumine, um inibidor da síntese de prostaglandinas, diminui a mobilidade embrionária em éguas gestantes, principalmente aos 12 e 14 dias. Mas não alterou significativamente os níveis séricos de progesterona (P_4), o tamanho do conceito e o tônus uterino.

2.7 Fixação

A fixação se refere ao término da mobilidade embrionária, ocorrendo pelo 16º dia na espécie equina (GINTHER, 1995). O aumento no tônus e a diminuição do lúmen uterino associado ao aumento no diâmetro do conceito, causam a imobilização da vesícula em um dos cornos uterinos geralmente próximo à bifurcação (GINTHER, 1998).

Segundo Gastal et al., (1996), no momento da fixação o tônus uterino aumenta ao mesmo tempo que uma mudança no padrão de contratilidade do útero é observada, indicando que a mudança na contratilidade é resultado e não fator contribuinte para a fixação.

A fixação do embrião está associada a uma flacidez e perda de ácido siálico das glicoproteínas capsulares. A uterocalina é uma proteína produzida pelo endométrio da égua que possui forte associação com a cápsula. Segundo Arar et al. (2007), deficiências na produção de uterocalina, podem gerar cápsulas defeituosas, que mostram uma falha na perda de ácido siálico, interferindo no processo de fixação embrionária.

2.8 Cálices Endometriais

A partir dos 25 - 36 dias (STEWART; LENNARD; ALLEN 1995), uma cinta de células trofoblásticas especializadas começa a se formar circundando o embrião na região de

mesoderma avascular, entre o saco vitelínico e alantóide, a chamada cinta coriônica (GINTHER, 1992). Aos 35 -36 dias algumas dessas células invadem o epitélio endometrial e se diferenciam em células dos cálices (ENDERS; LIU, 1991), responsáveis pela produção da gonadotrofina coriônica equina (eCG) até aproximadamente os 120 dias de gestação (ALLEN et al., 2002). O pico de secreção ocorre aos 55 a 70 dias de gestação, devido aos cálices estarem em seu maior tamanho nesse período (ALLEN, 2000).

O eCG é um hormônio glicoproteico com alto peso molecular que juntamente com o hormônio folículo estimulante (FSH) produzido pela hipófise, estimula o desenvolvimento dos corpos lúteos acessórios, mantendo a produção de P_4 até aproximadamente os 100 dias de gestação, quando então a placenta assume a produção. O eCG possui um componente que age como hormônio luteinizante (LH) e que estimula a formação dos corpos lúteos acessórios através da luteinização dos folículos, com ou sem ovulação dos mesmos, aumentando a produção de P_4 (ALLEN, 2001).

Por volta dos 80 a 90 dias de gestação, ocorre uma intensa resposta leucocitária materna provocando a degeneração e destruição dos cálices (LUNN; VAGNONI; GINTHER, 1997; SHARP, 2000).

3 RECONHECIMENTO MATERNO DA PREENHEZ

Para que a gestação ocorra de maneira adequada, é necessária uma precisa interação entre o embrião e o ambiente uterino (KLEIN; TROEDSSON, 2011a). Ao chegar no útero, o embrião indica sua presença e interrompe o ciclo estral, mantendo a gestação, em um processo chamado de reconhecimento materno da prenhez (SHORT, 1969).

Em algumas espécies como ruminantes e suínos, esse processo já é conhecido, ao contrário da espécie equina, cujo sinal do reconhecimento materno da prenhez derivado do embrião ainda não foi identificado (KLOHONATZ; BOUMA; BRUENMER, 2013).

3.1 Manutenção do Corpo Lúteo

Durante a fase de diestro, o endométrio está preparado para a luteólise ou manutenção do corpo lúteo. O evento que acontecerá é dependente da capacidade do embrião em sinalizar sua presença e impedir que a luteólise ocorra, mantendo a produção de P_4 e a gestação (SHORT, 1969). Para tal, a mobilidade embrionária dos sete aos 17 dias é fundamental para que esse sinal de reconhecimento materno da prenhez liberado pelo concepto entre em contato com todo o útero (ALLEN, 2000).

A $PGF_2-\alpha$ é um hormônio produzido pelo endométrio e possui efeito luteolítico. No dia 14 após ovulação, a regressão do corpo lúteo coincide com a produção pulsátil de $PGF_2-\alpha$ pelo endométrio, mensurada indiretamente pelo aumento na circulação sistêmica dos seus metabólitos 13,14-dihidro-15-keto $PGF_2-\alpha$ (KINDAHL et al., 1982).

Segundo McDowell e Sharp (2011), existem três mecanismos para evitar a luteólise: [1] prevenir a secreção de $PGF_2-\alpha$, [2] alterar sua distribuição de forma que ela não chegue apropriadamente no corpo lúteo, [3] secretar uma substância que iniba a ação da $PGF_2-\alpha$, no corpo lúteo.

Estudos demonstram que o endométrio de éguas gestantes é capaz de produzir $PGF_2-\alpha$ *in vitro*, mas na presença do concepto esta secreção fica diminuída, indicando que o embrião seja o responsável por esse efeito (VERNON et al., 1981).

3.2 Alterações Endometriais

O útero é um órgão do sistema endócrino, que produz e sofre ação de diversos hormônios que controlam sua atividade secretora quantitativa e qualitativamente (BLANCHARD et al., 2003).

O complexo tecido endometrial equino é composto de vários tipos celulares: epitélio luminal e glandular, estroma e vasos. Estímulos hormonais agem sobre esses tipos celulares e estes respondem alterando o endométrio de uma forma cíclica em sua aparência histológica, em função dos níveis de esteroides ovarianos (SCHLAFER, 2007).

Durante o estro, ocorre uma proliferação do estroma e no diestro uma proliferação epitelial, dividindo a proliferação do endométrio em duas fases (AUPPERLE et al., 2000).

3.2.1 Histologia

Ambos hormônios, estradiol (E_2) e P_4 provocam mudanças nos tecidos reprodutivos da égua durante o ciclo estral e a prenhez inicial (GINTHER, 1992).

Exames histológicos de éguas em início de estro, evidenciam o epitélio luminal alcançando o pico da sua altura (20 – 30 μm podendo chegar a 50 μm). No final do estro, em algumas éguas, esse epitélio parece diminuir para colunar baixo (15 μm). São comuns nessa fase do ciclo estral, a presença de vacúolos citoplasmáticos nas células do epitélio luminal e a marginalização ou acúmulo de neutrófilos em capilares e circundando vênulas no lúmen uterino (KENNEY, 1978).

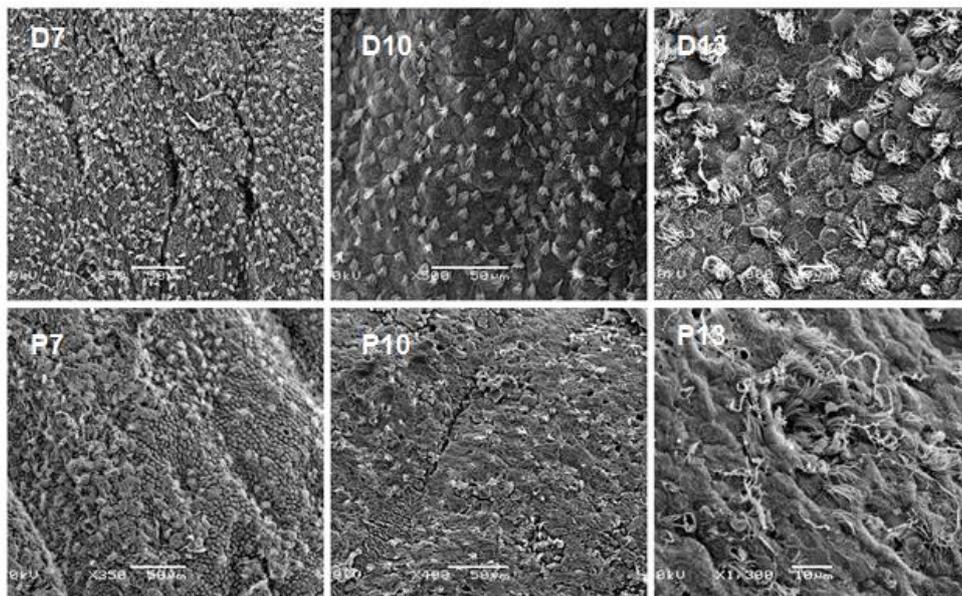
Nos primeiros sete dias do diestro, o epitélio luminal se apresenta colunar alto (20 μm) ou baixo (15 μm) e ocasionalmente cúbico (10 μm). Depois do sétimo dia de diestro, o epitélio apresenta um aumento na sua altura (15 μm alcançando 20 μm ou mais), antes da chegada do estro. Devido à diminuição do edema no estroma uterino, a densidade de glândulas normalmente aumenta. O aumento da tortuosidade das glândulas também ocorre (KENNEY, 1978).

No sétimo dia de gestação o epitélio glandular torna-se mais alto e as glândulas endometriais aumentam o seu diâmetro. No décimo dia há um aumento da secreção nas glândulas endometriais e a partir do 13º sua luz aumenta demonstrando uma rápida adaptação do útero à nova realidade (MATTOS et al., 2015).

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Assim que o embrião entra no útero, este sofre diversas modificações. Mattos et al. (2015), avaliaram através de microscopia eletrônica de varredura o endométrio de éguas prenhes e em diestro, aos sete, dez e 13 dias. Como resultados, foi observada uma redução das células ciliares no útero de éguas prenhes aos sete dias em relação a éguas no mesmo dia do diestro, e o número dessas células diminui ainda mais no transcorrer dos dias. No grupo de éguas prenhes aos sete dias, foi observada uma maior presença de células secretórias microvilosadas ingurgitadas e de material histotrófico encobrendo partes do epitélio. A secreção desse material aumenta com o passar dos dias, deixando submersas parte das células ciliares. No 13º dia de gestação, um aumento das aberturas glandulares se mostra evidente e restritas à essa abertura, estão as células ciliadas. Neste período, o histotrofo se mostra presente difusamente na superfície luminal do útero. Figura 1.

Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do endométrio de éguas em diestro (D7, D10 e D13) e éguas prenhes (P7, P10 e P13).



Fonte: Mattos et al. (2015)

3.2.3 Vascularização

A interação do embrião com o endométrio promove alterações no fluxo sanguíneo uterino. Utilizando ecografia Doppler, Silva et al. (2005) monitoraram a perfusão sanguínea no endométrio de ambos os cornos uterinos começando no dia seguinte à ovulação até o dia

16. Constataram que após o dia 12, havia um aumento significativo na vascularização do endométrio quando o embrião permanecia por mais de sete minutos em um mesmo local. Após a fixação, a perfusão se mantinha significativamente mais elevada no corno uterino gravídico, talvez como resultado dos estrógenos e prostaglandinas secretadas pelo embrião. O conceito desempenha um papel ativo na vasculogênese uterina, favorecendo a chegada de nutrientes importantes após a fixação (SILVA et al., 2011).

3.3 Proteínas do Fluido Endometrial

A P₄ produzida pelo corpo lúteo é responsável pela secreção de uma gama de proteínas pelo endométrio. McDowell et al. (1990) analisaram o perfil proteico do fluido uterino de éguas através de eletroforese bidimensional e verificaram que as proteínas se alteravam com o passar dos dias após a ovulação. Ainda, destacaram que o perfil proteico de éguas prenhes aos 12 e 14 dias era semelhante ao de éguas não prenhes nos mesmos dias.

Dentre as diversas proteínas encontradas no fluido uterino, as principais são: uteroglobina, uteroferina e uterocalina. Esta última é uma proteína secretada unicamente pelo endométrio da égua. (BEIER et al., 1995). Outras proteínas incluem proteína uterina Mx (HICKS et al., 2003), fator de crescimento transformante β 1 (LENNARD; STEWART; ALLEN, 1995), fator de crescimento epidérmico (STEWART et al., 1994) e osteopontina (AL-RAMADAN et al., 2002).

Essas proteínas são essenciais para o desenvolvimento do embrião e da placenta, no entanto, não se tem conhecimento do seu efeito no reconhecimento materno da prenhez (MCDOWELL; SHARP, 2011).

3.3.1 Uterocalina

A uterocalina, também conhecida como P19, é uma proteína secretada exclusivamente pelo endométrio da égua (BEIER et al., 1995). Sua expressão é dependente de P₄, inclusive a aplicação exógena deste hormônio em éguas em anestro, induz um aumento na expressão da proteína (CROSSETT et al., 1998).

Essa proteína é secretada no lúmen uterino em grandes quantidades durante o ciclo estral e a gestação inicial, sendo demonstradas em biópsias a partir de dois dias após ovulação (CROSSETT et al., 1998).

A uterocalina possui intensa associação com a cápsula que circunda o embrião (CROSSET et al., 1998). Klein e Troedsson (2011b) demonstraram, que o RNAm para a proteína mostrava quantidades moderadas em embriões de oito dias, mas essa quantidade diminuía à medida que o concepto se desenvolvia (dez, 12 e 14 dias). Os autores relacionaram essa diminuição na expressão como consequência das grandes quantidades de uterocalina fornecidas pelo útero ao concepto, uma vez que Merkl et al. (2010) evidenciaram altos níveis endometriais de RNAm para uterocalina no dia 12 da prenhez.

3.3.2 Osteopontina

A osteopontina é uma proteína de origem extracelular que promove a união e comunicação entre as células através de sua ligação às integrinas (WANG; DENHARDT, 2008).

Al-Ramadan et al. (2002) avaliaram por imunofluorescência indireta a presença de osteopontina no endométrio equino e verificaram que a intensidade de coloração é maior nas amostras dos dias 21 e 27 de prenhez em relação as amostras dos dias 14 e 17. Com esses resultados, os pesquisadores sugerem que a osteopontina seja um potencial mediador na implantação do embrião, agindo como uma ponte entre as integrinas produzidas pelo concepto e útero.

Avaliando a expressão de osteopontina em embriões, Klein e Troedsson (2011b) demonstraram que embriões do dia 14 tem expressão reduzida de osteopontina (RNAm) quando comparados aos do dia oito. Esse resultado leva acreditar que essa diminuição contribui à prolongada pré-implantação na espécie equina.

3.4 Hormônios e Receptores

3.4.1 Progesterona

Estradiol e progesterona promovem alterações nos tecidos reprodutivos da égua durante o ciclo estral e a prenhez inicial (GINTHER, 1992). Esses hormônios promovem suas ações após a ligação em seu receptor localizado nos núcleos celulares (CLARK; PECK; MARKAVERICH, 1987). Este complexo ligante-receptor interage com o DNA para regular a expressão gênica, regulando o crescimento e a diferenciação endometrial - modelo "clássico" de ativação via genômica (CLARK; PECK; MARKAVERICH, 1987; HARTT et al., 2005).

A P₄ é o principal hormônio da gestação, responsável por uma série de mudanças no trato reprodutivo, principalmente endométrio, necessárias para a sobrevivência do embrião. Antes da implantação, o concepto é mantido unicamente pelas secreções que se acumulam no lúmen uterino, o histotrofo (ASHWORTH, 1995).

A P₄ regula a expressão de diversas proteínas do fluido uterino, uma delas é a uterocalina, sendo possível estimular sua secreção mediante a administração exógena de P₄ em éguas em período de anestro (CROSSETT et al., 1998; HOFFMANN et al., 2009). Uteroglobina e uteroferrina também são dependentes da P₄ (BEIER et al., 1995). Segundo Gillies et al. (1999), a expressão de MUC 1, também parece estar regulada pela P₄ e o E₂.

Além de sua ação indireta através da produção de histotrofo pelo útero, a P₄ também possui efeito direto no concepto. Rambags et al. (2008) estudaram a expressão de receptores de progesterona e estrógeno em embriões D 7, 10 e 14, avaliando a expressão desses receptores na sua apresentação clássica (intracelular) e também uma forma caracterizada recentemente, a de receptores de progesterona ligados à membrana. Com relação aos receptores de P₄, eles constataram que o embrião equino expressa receptores intranucleares, que diminuiriam ao longo dos dias. Entretanto, receptores de progesterona ligados à membrana, se mostraram em níveis elevados, indicando que a ação direta da P₄ durante estes dias da gestação é feita, provavelmente, por uma via mais rápida e não pela via clássica.

3.4.2 Estrógenos

Embora tenha sido descartada a teoria de que na égua os estrógenos sejam os responsáveis pelo sinal de reconhecimento materno da prenhez, a sua importância na manutenção da gestação é aceita (MCDOWELL; SHARP, 2011).

Segundo Zavy et al. (1984), concentrações de estradiol estão elevadas no lúmen uterino de éguas do décimo ao 20º dia de gestação. Estes estrógenos estão envolvidos na migração do embrião pelo útero, mudanças na tonicidade uterina, vascularização e atividade secretora endometrial antes da fixação do embrião (STOUT; ALLEN, 2001b).

Assim como a P₄, o estrógeno também está relacionado com a expressão de proteínas do fluido uterino, como a uteroferrina (BEIER et al., 1995) e MUC 1 (GILLIES et al., 1999).

O estrógeno também melhora a secreção endometrial do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1) em outras espécies, embora na égua isto não tenha se confirmado (WALTERS; ROSER; ANDERSON, 2001). Salute e Tucker (1992) detectaram IGF-1 em lavados uterinos de éguas prenhes nos dias 12, 14, 16 e 17. O IGF-1 promove o

desenvolvimento embrionário por meio da diminuição da apoptose e pelo incremento da proliferação celular em coelhos (HERRLER; KRUSCHE; BEIER, 1998), e também participa da regulação de várias funções endometriais nos mamíferos (KURAR et al., 2010).

Stout e Allen (2001b) sugeriram que os estrógenos derivados do embrião podem estimular a liberação circunscrita de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ a partir do endométrio. Klein et al. (2010), analisando amostras endometriais de éguas prenhes no dia 13,5 encontraram 1,6 vezes menos níveis de RNAm para o receptor de $\text{E}_2\text{-}\alpha$ quando comparadas com as amostras extraídas de éguas cíclicas. O mesmo resultado foi verificado por Klohonatz, Bouma e Bruenmer (2013) em amostras endometriais dos dias 14, 16 e 18, demonstrando, que nos dias mais importantes do reconhecimento da gestação ocorre uma diminuição dos receptores de E_2 . Segundo Hatsumi e Yamamuro (2006) os estrógenos podem autorregular a expressão do seu próprio receptor, tanto positiva quanto negativamente, dependendo do tipo de célula examinada, por isso Klein et al. (2010) sugerem que essa diminuição do RNAm de receptores de $\text{E}_2\text{-}\alpha$ é feita pelos estrógenos embrionários.

Rambags et al. (2008) detectaram RNAm do receptor de estrógeno β em embriões nos dias dez, 12 e 14. A presença de receptores esteroidais no conceito eleva a possibilidade de que estes auxiliem no desenvolvimento embrionário de uma maneira autócrina - parácrina, além da indireta, através dos seus efeitos no endométrio (RAMBAGS et al., 2008).

Muitos estudos já foram realizados para saber qual a relação entre o E_2 produzido pelo conceito e o sinal do reconhecimento da prenhez, obtendo resultados contraditórios. Berg e Ginther (1978) fizeram administração de cinco mg de dietilestilbestrol diariamente em éguas não prenhes entre os dias sete e 18 após a ovulação e alcançaram manutenção lútea acompanhada de supressão do desenvolvimento folicular. No entanto o dietilestilbestrol é um estrógeno sintético não esteroidal, que não é secretado pelo embrião naturalmente e não assemelha uma situação fisiológica, evidenciado pela supressão folicular. Para os autores, o aumento no intervalo interovulatório ocorreu pela supressão folicular e não pela manutenção lútea.

Vanderwall et al. (1994) fizeram infusão contínua com seis mg de 17β -estradiol no útero de éguas não gestantes nos dias 10-16 após a ovulação e não obtiveram diferença significativa no prolongamento da função lútea comparando tratadas e controle. Goff, Sirois e Pontbriand (1993) observaram que nem a administração sistêmica de $17\text{-}\alpha$ estradiol (1 mg) ou estradiol (1 mg) em dias alternados entre sete e 15 do ciclo estral, nem a deposição intrauterina de esferas impregnadas com estradiol causou atraso na lise do corpo lúteo.

Estudos mais recentes de Wilsher e Allen, (2011) com infusão intrauterina de E₂ em óleo mineral mostram que não houve alteração no tempo de duração do corpo lúteo.

3.4.3 Ocitocina

Embora o mecanismo não seja tão conhecido como em ruminantes e suínos, a ocitocina desempenha um importante papel na luteólise em éguas pelo estímulo à liberação de PGF₂- α (MCDOWELL; SHARP, 2011).

O corpo lúteo da égua produz pequenas quantidades de ocitocina, mas não existem evidências que ela tenha importância na regulação da função reprodutiva. Assim como em outras espécies, no equino a ocitocina é produzida pelo hipotálamo e liberada pela hipófise. Estudos mensurando efluxo de ocitocina da hipófise, mostraram que aumento nos pulsos de metabólitos da prostaglandina coincidem com aumento nos pulsos de ocitocina (VANDERWALL; SILVIA; FITZGERALD, 1998).

Acredita-se que a PGF₂- α produzida pelo endométrio é quem inicia a secreção de ocitocina pela hipófise no início da luteólise na égua (VANDERWALL; SILVIA; FITZGERALD, 1998), mas ainda não se sabe o que estimula a liberação inicial da PGF₂- α . A ocitocina pituitária por sua vez, liga-se ao seu receptor no útero e estimula a secreção de PGF₂- α endometrial, estabelecendo uma retroalimentação positiva (KLEIN; TROEDSSON, 2011a). Ao se ligar em seu receptor a ocitocina gera uma cascata de eventos que terminam por ativar a fosfolipase A, liberando ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana. Este é metabolizado pela enzima prostaglandina-endoperoxídeo sintase 2, conhecida como ciclo-oxygenase 2, que produz a PGF₂- α (BOERBOOM et al., 2004).

No entanto, os estudos relacionando ocitocina e PGF₂- α são um pouco contraditórios, tanto os *in vitro* como *in vivo*, estes principalmente quanto a dose e via de administração. Quando a ocitocina é administrada em éguas não gestantes entre os dias onze e 13 após ovulação, os metabólitos da prostaglandina se elevam, no entanto, isso fica inibido nas gestantes (GOFF; PONTBRIAND; SIROIS, 1987). Através de estudos *in vitro*, Smith (2000), mostrou que a ocitocina estimula liberação de PGF₂- α do tecido endometrial, mas a magnitude da resposta é diferente dependendo do dia do ciclo em que a amostra de tecido é obtida. Ele demonstrou que houve uma maior liberação de PGF₂- α do tecido endometrial no dia 15 do ciclo do que em amostras de estro, onze e 13 dias. Segundo Neely, Stabenfeldt e Sauter (1979) a administração de ocitocina até o dia oito não induz luteólise.

Em contrapartida, pesquisadores acreditam que a ocitocina exógena possa causar manutenção do corpo lúteo em éguas não gestantes. A aplicação de ocitocina diariamente do D 9 – 14 (GOFF; PONTBRIAND; SIROIS, 1987) assim como a administração da mesma duas vezes ao dia do oitavo ao 14º dia após a ovulação (VANDERWALL; RASMUSSEN; WOODS, 2007), resultou em concentrações elevadas de P₄ e não retorno ao estro. Segundo Goff, Pontbriand e Sirois (1987) a receptividade endometrial à ocitocina se desenvolve em torno do dia onze após a ovulação e Stout, Lamming e Allen (1999) demonstraram que para resultar em prolongamento real da fase lútea, a administração sistêmica de ocitocina tem que ser iniciada antes do dia dez.

Segundo Boerboom et al. (2004), éguas não prenhes apresentam um aumento do RNAm de proteínas e da enzima prostaglandina-endoperóxido sintase 2, envolvida na síntese de PGF₂- α , coincidindo com o momento da luteólise. No entanto, em éguas prenhes, tal aumento não acontece, indicando que possivelmente a transcrição reprimida desta enzima se deve a um produto secretado pelo concepto.

A resposta à ocitocina também se altera durante a prenhez. Segundo McDowell e Sharp (2011) éguas prenhes apresentam diminuição na liberação de PGF₂- α quando foi administrado ocitocina. Sharp et al. (1997) verificaram que éguas não gestantes mostram um menor número de receptores de ocitocina durante o estro e apresentam um aumento constante destes receptores até o dia 12, enquanto dos dias 12 ao 14 ocorre um aumento súbito muito significativo. No entanto, em éguas gestantes esse aumento súbito não acontece, indicando que essa regulação na concentração de receptores possa ser importante para o reconhecimento da prenhez. Os autores ainda sugerem que o concepto produz substâncias que interferem na ligação da ocitocina ao seu receptor.

Starbuck et al. (1998) mensuraram receptores de ocitocina em éguas aos dez, 14 e 18 dias do ciclo estral e prenhez e verificaram que ambas possuíam quantidades semelhantes aos dez dias, porém as não gestantes tiveram três vezes mais receptores no dia 14 do que no dia dez e 18, e esse aumento evidente não ocorreu nas prenhes. Ao contrário, Merkl et al. (2010) verificaram um pequeno aumento de RNAm para receptores de ocitocina no endométrio com 12 dias de prenhez. No entanto, alguns autores acreditam que a prevenção da luteólise na égua gestante não dependa da inibição do aumento dos receptores para ocitocina (BOERBOOM et al., 2004), mas da sensibilidade do mesmo (STARBUCK et al., 1998).

3.4.4 Prostaglandina

A $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ é um hormônio produzido pelo endométrio da égua e responsável pela lise do corpo lúteo por volta do 14º dia após ovulação em éguas não gestantes (DOUGLAS; GINTHER, 1972). A liberação pulsátil de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ é mensurada indiretamente pela via sistêmica por seu metabólito 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$. Seu aumento coincide com uma diminuição nos níveis de P_4 , sugerindo portanto o efeito da $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ como fator luteolítico. No entanto, isso não ocorre na presença do concepto, sendo a liberação de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ alterada (KINDAHL et al., 1982).

Estudos *in vitro* mostram que o endométrio de éguas prenhes é capaz de produzir $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, no entanto sua capacidade de liberá-la fica diminuída na presença do concepto (VERNON et al., 1981). Douglas e Ginther (1976) mostraram que as concentrações de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ no plasma da veia uterina de éguas gestantes ao décimo e 14º dias foram menores do que nos mesmos dias durante o ciclo estral. Lavados uterinos de éguas prenhes do dia 14 – 16 contém menos $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ do que éguas cíclicas de dias equivalentes (BERGLUND et al., 1982), porém lavados de éguas prenhes no dia 18 contém concentrações similares às observadas durante o momento da luteólise em éguas cíclicas (STOUT; ALLEN, 2002). Dessa forma, os autores concluíram que o embrião tende a retardar o processo de liberação de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, mais do que impedi-lo durante o reconhecimento materno da prenhez.

Como já mencionado, os estrógenos aumentam a liberação de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ no endométrio tanto *in vitro* e *in vivo*, por isso Stout e Allen (2001b) sugeriram que os estrógenos derivados do embrião podem estimular a liberação circunscrita de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ a partir do endométrio.

A secreção de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ endometrial tem uma relação com a ocitocina, como já descrito no item 3.4.3, onde a ligação desta em seu receptor desencadeia uma cascata de eventos que termina com a produção de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ (BOERBOOM et al., 2004).

Estudos envolvendo substâncias não farmacológicas envolvidas no processo de inibição da luteólise estão sendo estudadas. Nie, Johnson e Wenzel (2001) avaliaram o efeito da introdução intrauterina de uma bola de vidro de 35 mm em relação à duração do corpo lúteo, mostrando que a mesma resultou em prolongamento da fase lútea em 39% das éguas. A hipótese é que esse objeto cause uma inflamação crônica, que cursa com a liberação contínua de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, evitando assim o pico dessa substância responsável pela luteólise. Rivera del Alamo et al. (2008) fizeram um estudo parecido, mas utilizando bolas de plástico cheias de água e obtiveram prolongamento da fase lútea em 75% das éguas.

Wilsher e Allen (2011) estudaram a infusão intauterina de óleo de côco fracionado e óleo de amendoim e obtiveram persistência lútea em 92% das éguas tratadas. Esse efeito pode estar relacionado ao ácido cáprico, presente em grandes quantidades no óleo de côco fracionado e que possui uma alta ação inibidora sobre as enzimas prostaglandina-endoperóxido sintase 1 e 2, envolvidas na síntese da $PGF_2-\alpha$ (HENRY et al., 2002). Além deste, o ácido linoleico, componente do óleo de amendoim, tem sido considerado um possível mediador na redução da secreção $PGF_2-\alpha$ pelo útero de vacas prenhes em resposta ao interferon-tau secretado pelo embrião (THATCHER; MEYER; DANET-DESNOYERS, 1995).

3.5 Interferons

Embora seja conhecido que em ruminantes o reconhecimento materno da prenhez ocorre devido à liberação de interferon tau pelo embrião, estudos na espécie equina ainda não demonstraram evidências fortes do envolvimento dos interferons nesse processo.

Baker, Adams e McDowell (1991) avaliando a expressão de interferon α -1, ômega 1 e 2 pelo embrião nos dias 13, 15, 20 e 25, mostraram que não houve expressão dos mesmos nestes dias.

Estudos mais atuais mostraram a expressão de dois novos genes de interferon-delta, pelo tecido do concepto equino nos dias 16 e 22 (COCHET; VAIMAN; LEFÈVRE, 2009), embora na fase inicial de desenvolvimento essa produção seja desprezível, indicando que este não seja produzido em quantidades que afetam o reconhecimento materno (BUDIJK; LUSSY; AURICH, 2010).

KLEIN et al. (2011b) também demonstraram a expressão do interferon estimulador do gene 15 durante a prenhez inicial e o período de fixação no endométrio. No entanto, não houve diferença na expressão desse gene entre éguas prenhas e cíclicas aos 14 dias após a ovulação e aos 50 dias de gestação.

No entanto, ainda não se têm evidências fortes da função dos interferons no reconhecimento materno em equinos.

3.6 Fator Antiluteolítico

Com base nos resultados de estudos referentes aos eventos envolvidos na gestação inicial, acredita-se que o embrião produza um fator responsável pela inibição na síntese de $PGF_2-\alpha$ e conseqüentemente da luteólise. Sharp et al. (1989) incubando tecido endometrial

juntamente com membranas de embrião contidas em sacos de diálise de 12.000 - 14.000, 6.000 - 8.000, 3.500 e 1.000 Daltons (Da), verificaram que apenas no saco de 1.000 Da não havia inibição da produção de $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, sugerindo que o fator produzido pelo embrião é menor do que 3.500 Da, e maior do que a maioria dos íons comuns, esteróides ou até algumas prostaglandinas.

Ababneh et al. (2000) encontraram atividade antiluteolítica em frações de 3.000 - 10.000 Da. Em seguida, realizaram a incubação com proteinase K e carvão revestido com dextran, que resultou na remoção da atividade antiluteolítica do fator na presença de carvão revestido com dextran, se mostrando portanto, resistente à proteinase K.

4 CONCLUSÃO

O período inicial da gestação é um momento crítico e decisivo na manutenção da prenhez. Tendo em vista as grandes perdas que ocorrem durante essa fase e o efeito econômico que elas ocasionam, o estudo e entendimento dos eventos que ocorrem durante essa etapa são fundamentais. A perfeita interação e comunicação entre embrião e endométrio é que determinam o sucesso da gestação, como já citado, o embrião sinaliza sua presença, fazendo com que ocorra a manutenção do corpo lúteo, porém o fator secretado pelo concepto que promove esse efeito antiluteolítico, ainda está por ser elucidado. Embora muito já se tenha avançado em relação à transcriptoma e proteômica relacionadas às interações materno-fetais, mais estudos são necessários para se obter um maior entendimento desses eventos.

REFERÊNCIAS

- ABABNEH, M. M. et al. Partial characterization of an equine conceptus prostaglandin inhibitory factor. **Journal of. Reproduction and. Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 607-613, 2000.
- ALLEN, W. R. et al. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 2, p. 237-246, 2002.
- ALLEN, W. R. et al. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 39, n. 5, p. 438-445, 2007.
- ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 46, 2000, San Antonio, Texas. **Proceedings...** San Antonio, Texas: AAEP, 2000. p. 338-354.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 513-527, 2001.
- ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 209-223, 2005.
- AL-RAMADAN, S. et al. Distribution of integrin subunits, muc-1, and osteopontin in equine uterine epithelium and conceptuses during early pregnancy. In: Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction's, 48, 2002, Baltimore, Maryland. **Proceedings...** Baltimore, Maryland: SSR, 2002. p. 28-31, 2002.
- ARAR, S. et al. Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 8, p. 1110-1115, 2007.
- ASHWORTH, C. J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 99-105, 1995.
- AUPERLLE, H. et al. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 32, n. 3, p. 228-232, 2000.
- BAKER, C. B.; ADAMS, M. H.; MCDOWELL, K. J. Lack of expression of alpha or omega interferons by the horse conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, n. 2, p. 439-443, 1991.
- BAZER, F. W. et al. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, Cambridge, v. 138, n. 2, p. 195-209, 2009.

BEIER, H. K. et al. Partial sequencing and identification of three proteins from equine uterine secretion regulated by progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 295-298, 1995.

BERG, S. L.; GINTHER, O. J. Effect of estrogens on uterine tone and life span of the corpus luteum in mares. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 47, n. 1, p. 203-208, 1978.

BERGLUND, L. A. et al. Effect of pregnancy and collection technique on prostaglandin F in the uterine lumen of Pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 335-341, 1982.

BETTERIDGE, K. J. et al. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v. 135, n. 1, p. 191-209, 1982.

BETTERIDGE, K. J.; MITCHELL, D. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 39, n. 1, p. 145-148, 1974.

BETTERIDGE, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 21, n. 8, p. 92-100, 1989.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 691-702, 2000.

BLANCHARD, T. L. et al. **Manual of Equine Reproduction**. 2 ed. Sant Louis: Mosby, 2003. 253 p.

BOERBOOM, D. et al. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, New York, v. 70, n. 2, p. 391-399, 2004.

BUDIK, S.; LUSSY, H.; AURICH, C. Quantification of different type I interferons in equine embryos at days 10-16 of gestation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121, p. 307-308, 2010.

CLARK, J. H.; PECK, E. J.; MARKAVERICH, B. M. Basic principles and measurement of steroid hormone receptors. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 31-68, 1987.

COCHET, M.; VAIMAN, D.; LEFÈVRE, F. Novel interferon delta genes in mammals: Cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. **Gene**, v. 433, n. 1-2, p. 88-99, 2009.

- CROSSETT, B. et al. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of Reproduction**, New York, v. 59, n. 3, p. 483-490, 1998.
- DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F_{2α} on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, New York, v. 2, n. 4, p. 265-268, 1972.
- DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins**, New York, v. 11, p. 251-260, 1976.
- ENDERS, A. C.; LIU, I. K. M. Trophoblast-uterine interactions during equine chorionic girdle cell maturation, migration, and transformation. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 192, n. 4, p. 366-381, 1991.
- FLEMING, T. P. et al. The embryo and its future. **Biology of Reproduction**, New York, v. 71, n. 4, p. 1046-1054, 2004.
- FLOOD, P. F.; JONG, A; BETTERIDGE, K. J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 57, n. 2, p. 291-294, 1979.
- GASTAL, M. O. et al. Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 46, n. 7, p. 1171-1180, 1996.
- GASTAL, M. O. et al. Effect of oxytocin, prostaglandin F_{2α}, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 50, n. 4, p. 521-534, 1998a.
- GASTAL, M. O. et al. Effect of PGE₂ on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 50, n. 7, p. 989-999, 1998b.
- GERSTENBERG, C.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 116, p. 167-175, 1999.
- GILLIES, L. K. et al. Patterns of MUC 1 expression in the equine endometrium and trophoblast during early pregnancy. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, n. 1, p. 225, 1999.
- GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2 ed. Madison, Wisconsin: Equiservices, 1992. 642 p.
- GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses**. Madison, Wisconsin: Equiservices, 1995. v. 2, 400 p.
- GINTHER, O. J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 44, 1998, Baltimore, Maryland. **Proceedings...** Baltimore, Maryland: AAEP, 1998. p. 73-104.

- GOFF, A. K.; PONTBRIAND, D.; SIROIS, J. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13,14-dihydro prostaglandin F-2 α during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 253-260, 1987.
- GOFF, A. K.; SIROIS, J.; PONTBRIAND, D. Effect of oestradiol on oxytocin-stimulated prostaglandin F2 alpha release in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 98, n. 1, p. 107-112, 1993.
- GRIFFIN, P. G.; CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 31, n. 3-4, p. 311-329, 1993.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Monole, 2004. 513 p.
- HARTT, L. S. et al. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor α and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 241-250, 2005.
- HATSUMI, T.; YAMAMURO, Y. Downregulation of estrogen receptor gene expression by exogenous 17 beta-estradiol in the mammary glands of lactating mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 3, p. 311-316, 2006.
- HAYES, M. A. et al. Changes in various endometrial proteins during cloprostenol-induced failure of early pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 723-741, 2012.
- HENRY, G. E. et al. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2231-2234, 2002.
- HERRLER, A; BEIER, H. M. Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 166, n. 2, p. 233-246, 2000.
- HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M. Horse conceptuses secrete Insulin-like Growth Factor-binding protein. **Biology of Reproduction**, New York, v. 62, n. 6, p. 1804-1811, 1998.
- HICKS, B. A. et al. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 8, n. 6, p. 1552-1561, 2003.
- HOFFMANN, C. et al. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 2, p. 264-274, 2009.
- KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 17, n. 23, p. 241-262, 1978.
- KINDAHL, H. et al. Progesterone, prostaglandin F-2 α , PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 353-359, 1982.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Maternal recognition of pregnancy in the horse: A mystery still to be solved. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 8, p. 952-963, 2011a.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional profiling of equine conceptuses reveals new aspects of embryo-maternal communication in the horse. **Biology of Reproduction**, New York, v. 84, n. 5, p. 872-885, 2011b.

KLOHONATZ, K. K.; BOUMA, G. J.; BRUENMER, J. E. Equine endometrial gene expression during maternal recognition of pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 33, p. 372, 2013.

KURAR, E. Expressions of Insulin-Like Growth Fator (IGF)-I, -II and their receptor genes are regulated in mare endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.45, n.3, p. 94, 2010.

LEFRANC, A. C., ALLEN, W. R. Endometrial gland surface density and hyperaemia of the endometrium during early pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 39, n. 6, p. 511-515, 2007.

LENNARD, S. N.; STEWART, F.; ALLEN, W. R. Transforming growth factor beta 1 expression in the endometrium of the mare during placentation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 2, p. 131-40, 1995.

LUNN, P.; VAGNONI, K. E.; GINTHER, O. J. The equine immune response to endometrial cups. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 203-216, 1997.

MAPA. **Equídeos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

MATTOS, R. C. O endométrio no transporte espermático e durante a gestação precoce. In: I Simpósio Nacional de Equinos, 1, 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SINEQ, 2015. p 28-44.

MCDOWELL, K. J. et al. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of Reproduction**, New York, v. 39, n. 2, p. 340-348, 1988.

MCDOWELL, K. J. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometria from pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 89, n. 1, p. 107-115, 1990.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C. Maternal Recognition of Pregnancy. In: MCKINNON, A. O. et al. (Ed). **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Wiley – Blackwell, 2011. v. 2, cap. 227, p. 2200-2210.

MERKL, M. et al. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. **Biology of Reproduction**, New York, v. 83, n. 5, p. 874-886, 2010.

- MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 34, n. 1, p. 51-60, 2002.
- NEELY, D. P.; STABENFELDT, G. H.; SAUTER, C. L. The effect of exogenous oxytocin on luteal function in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 55, p. 303-308, 1979.
- NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W. Use of a glass ball to suppress behavioral estrus in mares. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 47, 2001, San Diego, California, USA. **Proceedings...** San Diego, California, USA: AAEP, 2001. p. 246-248.
- RAMBAGS, B. P. B. et al. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. **Theriogenology**, Los Altos, v. 69, n. 3, p. 366-375, 2008.
- REILAS, T. **Uterine luminal environment of the mare**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Veterinary Medicine Faculty, University of Helsinki, Finlandia, 2001.
- RIVERA DEL ALAMO, M. M. et al. Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 1-2, p. 94-106, 2008.
- SALUTE, M. E.; TUCKER, K. E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in yolk sac fluid, uterine flush and conceptus conditioned media during early pregnancy in mares. **Biology of Reproduction**, New York, v. 46, p. 68, 1992.
- SCHLAFER, D. H. Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, Los Altos, v. 68, n. 3, p. 413-422, 2007.
- SHARP, D. C. et al. The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 37, p. 101-107, 1989.
- SHARP, D. C. et al. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 137-144, 1997.
- SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 679-689, 2000.
- SHORT, R. V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy, 1969, London. **Proceedings...** London: CFSFA, 1969. p. 2-26.
- SILVA, L. A et al. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, New York, v. 72, n. 3, p. 755-761, 2005.

SILVA, L. A. et al. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: An anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. **Reproduction**, Cambridge, v. 142, n. 4, p. 593-603, 2011.

SMITH, K. M. **The relationship between oxytocin and prostaglandin F2 α at the expected time of luteolysis in mares**. 2000. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - University of Kentucky, Lexington, 2000.

STARBUCK, G. R. et al. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 113, n. 2, p. 173-179, 1998.

STEWART, F. et al. Identification of the horse epidermal growth factor (EGF) coding sequence and its use in monitoring EGF gene expression in the endometrium of the pregnant mare. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 341-350, 1994.

STEWART, F.; LENNARD, S. N.; ALLEN, W. R. Mechanisms controlling formation of the equine chorionic girdle. **Biology of Reproduction**, New York, v. 1, p. 151-159, 1995.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Conceptus factors involved in the maternal recognition of pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 17, p. 53, 1996.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 771-775, 2001a.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Oestrogens and pregnancy maintenance in the mare : For or against ? **Pferdeheilkunde**, Calw, v. 17, p. 579-582, 2001b.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E(2) and F2- α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and diestrous mares. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, p. 261-268, 2002.

STOUT, T. A. E.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R. Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 315-320, 1999.

STOUT, T. A. E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 87, n. 3-4, p. 269-281, 2005.

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 49, p. 15-28, 1995.

VANDERWALL, D. K. et al. Corpus luteal function in non pregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E(2) or estradiol-17beta. **Theriogenology**, Los Altos, v. 42, n.7, p. 1069-1083, 1994.

VANDERWALL, D. K.; RASMUSSEN, D. M.; WOODS, G. L. Effect of repeated administration of oxytocin during diestrus on duration of function of corpora lutea in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 23, n. 12, p. 1864-1867, 2007.

VANDERWALL, D. K.; SILVIA, W. J.; FITZGERALD, B. P. Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂α. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 112, p. 337-346, 1998.

VERNON, M. W. et al. Prostaglandin F₂-α in the equine endometrium: steroid modulation and production capacities during the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, New York, v. 25, n. 3, p. 581-589, 1981.

WALTERS, K. W.; ROSER, J. F.; ANDERSON, G. B. Maternal-conceptus signalling during early pregnancy in mares: Oestrogen and insulin-like growth factor I. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 2, p. 331-338, 2001.

WANG, K. X.; DENHARDT, D. T. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 5-6, p. 333-345, 2008.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Intrauterine administration of plant oils inhibits luteolysis in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 43, n. 1, p. 99-105, 2011.

ZAVY, M. T. et al. Endocrine aspects of early pregnancy in pony mares: a comparison of uterine luminal and peripheral plasma levels of steroids during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, London, v. 115, n. 1, p. 214-219, 1984.