

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA NA  
PRENHEZ INICIAL DA ÉGUA.**

**Autor: Leonardo Glaeser Paul**

**Porto Alegre**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA NA  
PRENHEZ INICIAL DA ÉGUA.**

**Autor: Leonardo Glaeser Paul**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos  
da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS  
como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

**Orientador: Henrique Boll de Araujo Bastos**

**Coorientador: Rodrigo Costa Mattos**

**Porto Alegre**

**2023**

### CIP - Catalogação na Publicação

PAUL, LEONARDO GLAESER  
AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA NA  
PRENHEZ INICIAL DA ÉGUA. / LEONARDO GLAESER PAUL. --  
2023.

55 f.

Orientador: HENRIQUE BOLL DE ARAUJO BASTOS.

Coorientador: RODRIGO COSTA MATTOS.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. REPRODUÇÃO EQUINA . 2. IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO .  
3. HEMATOLOGIA DA GESTAÇÃO. 4. FISIOLOGIA DA GESTAÇÃO .  
5. ÉGUAS. I. BASTOS, HENRIQUE BOLL DE ARAUJO,  
orient. II. MATTOS, RODRIGO COSTA, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**LEONARDO GLAESER PAUL**

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA NA  
PRENHEZ INICIAL DA ÉGUA.**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Eduardo Malschitzky**

---

**Prof. Dra. Janislene Mach Trentin**

---

**Dra. Verônica La Cruz Bueno**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio incondicional. Aos meus pais em especial, que nunca mediram esforços para me incentivar na busca dos meus sonhos e objetivos. Aos meus irmãos por todo apoio. À minha mãe que deve estar muito feliz e contente com as minhas conquistas.

À minha namorada, Gabriella Velho, que a faculdade proporcionou conhecer, por todo carinho e companheirismo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Henrique Boll de Araujo Bastos, por todos os ensinamentos científicos e pessoais.

Ao meu coorientador, Rodrigo Costa Mattos, por todos ensinamentos durante o período de graduação e pós-graduação.

Ao Laboratório de Reprodução Animal - REPROLAB - e seus integrantes, por proporcionar todos os recursos necessários para o meu crescimento profissional, pessoal e para a realização desta pesquisa.

Aos colegas e proprietários dos animais que auxiliaram na coleta das amostras da pesquisa, principalmente à Vanessa Canal.

Ao Laboratório Zelle de Patologia Animal por aceitar participar e ajudar no desenvolvimento desta pesquisa.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Quantificação relativa (QR) da expressão gênica ( $\pm$  DP) de RLH, IL4 e TNF- $\alpha$  no sangue periférico de éguas no dia da indução da ovulação (-2) e nos dias 15, 25 e 45 de prenhez. <sup>ab</sup> Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ )..... 31
- Figura 2** Demonstração gráfica das variáveis do leucograma que apresentaram diferenças estatísticas entre os dias da indução da ovulação (-2) e os dias 15, 25 e 45 de prenhez. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos..... 33
- Figura 3** Demonstração gráfica das variáveis bioquímicas que apresentaram diferenças estatísticas entre os dias da indução da ovulação (-2) e os dias 15, 25 e 45 de prenhez. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos..... 35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sequência de primers e temperatura de anelamento utilizados para amplificação gênica e detecção de RNAm através de RT-qPCR.....	28
<b>Tabela 2</b>	Média dos valores referentes ao eritrograma dos grupos avaliados com seus respectivos valores de referência. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.....	32
<b>Tabela 3</b>	Média dos valores referentes ao eritrograma dos grupos avaliados com seus respectivos valores de referência. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.....	33
<b>Tabela 4</b>	Média dos valores referentes ao bioquímico dos grupos avaliados com seus respectivos valores de referência. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos. * representa tendência estatística.....	34

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Desenvolvimento embrionário e fetal.....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Cápsula embrionária.....	13
<b>2.2</b>	<b>Reconhecimento materno da prenhez.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Cálices endometriais .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Comunicação materno-embrionária e suas interações imunológicas. ....</b>	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Parâmetros hematológicos e bioquímicos da gestação.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Resumo.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>26</b>
3.3.1	Animais.....	26
3.3.2	Desenho experimental.....	26
3.3.3	Coleta e manipulação das amostras.....	27
3.3.4	Extração e transcrição reversa do RNAm.....	27
3.3.5	PCR em tempo real quantitativo.....	27
3.3.6	Análise sanguínea e bioquímica.....	28
3.3.7	Análise estatística.....	30
<b>3.4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
	<b>APÊNDICE A – RESUMO APRESENTADO NO XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL.....</b>	<b>49</b>
	<b>APÊNDICE B - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE AS VARIÁVEIS ANALISADAS.....</b>	<b>50</b>



## RESUMO

As alterações sistêmicas durante a prenhez na égua têm sido pouco estudadas, porém podem revelar pontos importantes da complexa fisiologia da interação materno-embrionária. Este trabalho tem como objetivo analisar as variações imunológicas, hematológicas e bioquímicas durante o período inicial da gestação equina. Foram coletadas amostras de sangue de oito éguas cíclicas durante a temporada reprodutiva, com idades variando de 6 a 15 anos. As amostras foram coletadas no dia da indução da ovulação (D -2), no 15º dia (D 15), no 25º dia (D 25) e no 45º dia (D 45) pós ovulação. Amostras de sangue foram coletadas através de venopunção jugular e encaminhadas, para a realização de hemograma, avaliação de metabólitos séricos e técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR). Foi realizado a expressão gênica de *interleucina 4* (IL-4), *fator de necrose tumoral* (TNF- $\alpha$ ) e *receptor de hormônio luteinizante* (RLH). Os metabólitos séricos analisados foram aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total, bilirrubina direta, albumina, fosfatase alcalina (FA), cálcio total, fósforo, creatinina, ureia e proteína sérica total. No hemograma, os eosinófilos, apresentaram um aumento na concentração entre os grupos D -2 para o D25, e uma diminuição significativa do D25 para o D45. Já os leucócitos segmentados, apresentaram uma redução significativa entre os grupos do D-2 e D15. A AST demonstrou uma tendência de aumento entre D-2 e D15 e maior concentração no D-2 em relação ao D25. A IL-4 apresentou aumento significativo no D15 e D25 em relação ao D-2, acompanhando o padrão dos eosinófilos. Os eosinófilos e os leucócitos segmentados têm papel importante no início da gestação, podendo ser reflexo da resposta imune celular ao aloenxerto fetal. Corroborando com os resultados a interleucina-4 confirma o resultado encontrado visto que os eosinófilos são responsáveis por parte da liberação desta citocina. Concluímos que alterações sistêmicas principalmente os eosinófilos e a IL-4 podem estar alterados seguindo o momento importante de reconhecimento materno e tolerância imunológica, que ocorre durante o período de prenhez inicial.

**Palavras-chave:** reprodução equina, prenhez, embrião

## ABSTRACT

Systemic changes during early pregnancy in the mare have been sparingly studied. However, they may reveal important aspects of the complex physiology of the embryo-maternal interaction. This study aimed to investigate immunological, hematological and biochemical variations during the initial period of equine pregnancy. Blood samples were collected from 8 cyclic mares during breeding season, with ages ranging from 6 to 15 years. The samples were collected on the day of ovulation induction (D -2) and on days 15 (D15), 25 (D25), and 45 (D45) after ovulation induction. The samples collected through jugular venipuncture were sent to a laboratory for hematological, biochemical analysis and real-time polymerase chain reaction (qPCR) technique. Gene expression of interleukin 4 (IL-4), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and luteinizing hormone receptor (LHR) was performed. The serum metabolites analyzed were aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin, direct bilirubin, albumin, alkaline phosphatase (AP), total calcium, phosphorus, creatinine, urea and total serum protein. In the blood count, eosinophils showed an increase in concentration between groups D -2 to D25, and a significant decrease from D25 to D45. The segmented leukocytes, showed a significant reduction between the groups of D-2 and D15. AST showed an increasing trend between D-2 and D15 and higher concentration on D-2 compared to D25. IL-4 showed a significant increase in D15 and D25 compared to D-2, following the pattern of eosinophils. Eosinophils and segmented leukocytes may play an essential role in early pregnancy, possibly reflecting the cellular immune response to the fetal semi-allograft. Corroborating the results, interleukin-4 confirms the result found, since eosinophils are responsible for part of the release of this cytokine. We conclude that systemic changes, mainly eosinophils and IL-4, can be altered following the important moment of maternal recognition and immunological tolerance, which occurs during the initial pregnancy period.

**Keywords:** *equine reproduction, pregnancy, embryo*

## 1 INTRODUÇÃO

A criação de equídeos brasileira ocupa, de acordo com dados da FAO (2017), a terceira posição dentre os países com maior população equina. Com uma população de aproximadamente 5,7 milhões de equinos (IBGE, 2021) o país perde apenas para Estados Unidos, México (ALLAN, 2021). A criação de equídeos no Brasil, segundo o MAPA / Câmara Setorial da Equideocultura - 2016, movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por três milhões de postos de trabalho (LIMA, 2016).

Dados como estes demonstram a importância do uso de biotecnologias e principalmente da compreensão dos eventos fisiológicos para máxima potencialidade da disseminação e propagação de genéticas superiores na reprodução equina. De acordo com Morris e Allen (2002) as perdas gestacionais entre os dias 15 e 35 da gestação podem ser classificadas como a principal causa de perdas econômicas na reprodução equina, fato que pode ser correlacionado com o critério de seleção nas raças, sendo características como performance e pedigree pontos críticos de seleção, deixando a fertilidade de ser analisada. Assim, fatores fisiológicos, capazes de influenciar negativamente a reprodução equina, podem ser selecionados ao longo das gerações (LEON et al., 2013).

A espécie equina, dentre os principais mamíferos de interesse zootécnico, é uma das poucas espécies domésticas que os sinais derivados do embrião para que haja o reconhecimento materno da prenhez (RMP) não foram identificados (KLEIN; TROEDSSON, 2011). O termo RMP foi cunhado por Short (1969) quando comparou as diferentes estratégias utilizadas pelas espécies de animais domésticos para garantir a manutenção da gestação, através da manutenção da função secretória do corpo lúteo, a fim de manter uma concentração adequada de progesterona para suportar a gestação.

Fácil de reconhecer, porém difícil de definir precisamente, a tolerância imunológica ao conceito se tornou um rico campo de desenvolvimento científico. A prenhez equina possui diversos atributos que tornaram o cavalo uma espécie útil para estudos de imunologia da gestação (ANTCZAK, 2012), principalmente como modelo experimental para humanos pela grande quantidade de

similaridades encontradas (NORONHA; ANTCZAK, 2010). A comunicação feto-maternal deve apresentar uma via de mão dupla durante a implantação, visto que há presença do aloantígeno derivado do pai, a unidade feto-placentária é considerada um aloenxerto que precisa escapar do reconhecimento e destruição pelo sistema imune materno (ALUVIHARE et al., 2004). O grande número de variáveis imunológicas, endócrinas e moleculares ditam este processo, sendo a falha da imunotolerância durante a prenhez passível de rejeição embrionária (OZEN et al., 2018).

Do outro lado os aspectos bioquímicos e hematológicos apresentam uma série de pesquisas envolvendo, em geral, o período final da gestação, parto e início do puerpério (HARVEY et al., 2005; OROZCO et al., 2007; CAMPELO, 2008; AOKI; ISHII, 2012; SOTUÉ, MONTESINOS, 2013; BAZZANO et al., 2014; FARAMARZI et al., 2018), com foco no conhecimento aplicado na clínica de éguas gestantes. A prenhez pode ser caracterizada por uma ampla quantidade de variações fisiológicas, estas se comparadas com fêmeas não gestantes, tendem a ser classificadas como estados patológicos (CHANDRA et al., 2012).

Poucos estudos realizaram análise sobre a comunicação imune materno-embrionária sistêmica durante o período inicial de prenhez. Este trabalho tem como objetivo analisar o padrão hematológico e bioquímico de éguas prenhes no período inicial da gestação, bem como analisar a expressão gênica de diferentes genes.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste tópico serão revisados os principais assuntos inerentes às alterações fisiológicas, imunológicas, hematológicas e bioquímicas da prenhez inicial da égua.

### **2.1 Desenvolvimento embrionário e fetal**

No princípio dos processos fisiológicos pós fecundação, pode-se observar as primeiras características que fazem da égua um modelo incongruente com os diversos mamíferos de grande porte. Segundo Flood et al. (1979) os oócitos fertilizados e não fertilizados são transportados diferentemente, onde apenas o primeiro passa pela união istimo-ampola. Fato este ocorrido pela apreciável capacidade secretora de Prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) do embrião, quando este alcança o estágio de mórula compacta aos cinco dias pós ovulação. Este hormônio atua localmente relaxando a parede muscular do oviduto permitindo o movimento do embrião em direção ao útero, alcançando-o cerca de 24 horas depois (WEBER et al., 1991).

#### **2.1.1 Cápsula embrionária**

A cápsula embrionária, também chamada de membrana terciária, se apresenta como uma fina camada depositada na superfície interna da zona pelúcida próximo à formação do blastocisto no útero. Fato este observado pela primeira vez em embriões frescos e confirmado pela microscopia eletrônica por Flood et al. (1982). A coincidência da formação da cápsula e do blastocisto no útero ampliou a possibilidade das células trofoblásticas e do tecido endometrial estarem envolvidos nesta formação. Esta hipótese foi confirmada posteriormente através da transferência de blastocistos bissectados sem zona pelúcida no dia sete e coletados novamente com crescimento aparentemente normal e com cápsula, uma semana depois da transferência. Com isso, demonstrou-se também que não havia necessidade de nenhum tipo de zona pelúcida como matriz para deposição de material capsular (MCKINNON et al., 1989). O mesmo grupo demonstrou que o cultivo in vitro de mórulas, ou de blastocistos que ainda não formaram sua cápsula, não resultarão na formação de uma cápsula embrionária apesar do desenvolvimento normal do blastocisto e da eclosão

ocasional da zona pelúcida. Confirmando a hipótese de que o útero está intimamente relacionado com a sua formação e desenvolvimento. Por outro lado, o blastocisto que já apresenta a cápsula formada, sempre a mantém em cultura (MCKINNON et al., 1989).

Além de fornecer força ao blastocisto em constante expansão para suportar as rigorosas contrações do miométrio que o impulsionam através do útero (BETTERIDGE, 1989) a cápsula do blastocisto também é importante na regulação e fornecimento de nutrientes para o embrião. Devido a sua negativa carga eletrostática e configuração incomum de glicocálice (ORIOLE et al., 1993) a cápsula acumula em sua superfície uma gama de proteínas e outros componentes das secreções das glândulas endometriais enquanto o embrião se move através do útero do dia 7 ao dia 17 pós ovulação (ALLEN, 2001).

Sua superfície rodeada de glicoproteínas apresenta caráter anti-adesivo, favorecido pela presença de mucina (BETTERIDGE, 1989), condição esta que explica e favorece a mobilidade embrionária nos primeiros dias em que o embrião se encontra no útero. A mobilidade do embrião equino e a sua fixação fornecem explicações para vários enigmas na biologia reprodutiva da égua prenhe e fornecem uma solução eficiente para o problema das gestações gemelares (GINTHER, 2021).

A função principal da mobilidade embrionária é manter um ambiente uterino que nutrirá o seu crescimento e o seu desenvolvimento através da absorção de metabólitos secretados pelo útero e para o útero pelo embrião, por toda extensão do útero (GINTHER, 2021). Essa função é refletida pelo aumento da contratilidade uterina (GRIFFIN; GINTHER, 1990), tônus, vascularização (SILVA et al., 2005) e do edema endometrial (GRIFFIN et al., 1993) através da atividade exercida pela mobilidade embrionária.

Estas funções uterinas, com exceção a vascularização, foram demonstradas pela pesquisa de Griffin et al. (1993) através da ligadura do corno uterino ipsilateral à ovulação, próximo à bifurcação uterina, dias antes da chegada do embrião ao útero, pelo fato de estarem presentes no corno contendo o embrião, diferentemente do restante do útero.

A cápsula começa a se desintegrar entre os dias 20 e 21, presumivelmente como resultado da ação de enzimas proteolíticas secretada pelo trofoblasto ou epitélio luminal do endométrio (DENKER et al., 1987). Por

volta do dia 21 após a ovulação, o embrião, com sua batida primitiva do coração, pode ser discernido em um dos polos da vesícula embrionária (VAN NIEKERK; ALLEN, 1975) e o alantoide está apenas aparecendo como uma protuberância do intestino posterior (EWART, 1915).

## 2.2 Reconhecimento materno da prenhez

A comunicação feto-maternal é fundamental para a manutenção da gestação em todas as espécies de mamíferos, porém, na égua, alguns destes eventos diferem em momentos equivalentes a outras espécies de animais domésticos (ALLEN, 2001). O desenvolvimento inicial do embrião, a implantação e a manutenção da gestação dependem criticamente de uma orquestrada e precisa interação entre o embrião e o ambiente uterino (KLEIN; TROEDSSON, 2011).

O “Reconhecimento Materno da Prenhez” (RMP) é comumente utilizado para descrever a continuidade de eventos responsáveis pela manutenção da gestação após a fecundação e chegada do embrião ao útero para posterior desenvolvimento (KLEIN; TROEDSSON, 2011). O RMP é o fenômeno pelo qual a luteólise do corpo lúteo é revogada para produção contínua de progesterona e é alcançada por diferentes agentes em diferentes espécies de mamíferos (RAHEEM, 2017).

Os processos descritos neste fenômeno são melhores entendidos em ruminantes domésticos e outros ungulados, como na espécie suína. O *interferon tau* foi identificado como um fator parácrino derivado do embrião que exibe propriedades antiluteolíticas em ruminantes (BAZER; SPENCER; OTT, 1997), enquanto os estrogênios derivados do embrião representam sinal primário de reconhecimento materno da prenhez em suínos (GEISERT, 1990).

A natureza do sinal embrionário para a luteoestase em éguas continua sendo um mistério (ALLEN, 2001), porém alguns sinais revelam grande importância na manutenção da prenhez na égua. De acordo com Aurich e Budik (2015), a manutenção da gestação equina provavelmente está envolvida pela secreção de um fator anti-luteolítico derivado do embrião. O rápido crescimento, a mobilidade e a presença de uma cápsula acelular no momento do RMP, ou seja, entre os dias 12 e 14, são pré-requisitos para evitar a perda gestacional.

Recentes estudos reforçam que as alterações no perfil proteômico do fluido uterino durante o desenvolvimento inicial do embrião estão diretamente relacionadas com a presença do embrião, sugerindo que estas alterações são cruciais para a manutenção da gestação (BASTOS et al., 2019).

### **2.3 Cálices endometriais**

Entre os dias 25 e 35 pós ovulação, evidencia-se um discreto espessamento anular e avascular do trofoblasto na região externa do córion entre a junção do saco vitelínico, já em regressão, e do saco alantóide, em constante crescimento (ALLEN, 2001). Esta região é denominada cinta coriônica, que atinge sua maturidade aos 35 ou 36 dias pós ovulação com a espessura de 9 mm (GINTHER, 1998). Parte destas células trofoblásticas da cinta coriônica são responsáveis por se ancorarem no endométrio formando assim os cálices endometriais (ENDERS; LIU, 1991) estruturas descritas primeiramente por Cole e Goss (1943). Estas células migram para o endométrio de forma que realizam fagocitose e digestão das células epiteliais do útero. O processo desnuda o epitélio endometrial, porém regenera-se rapidamente, deixando as células dos cálices de origem fetal dependentes do apoio do tecido materno. Formam-se grandes seios linfáticos abaixo de cada cálice e um número cada vez maior de linfócitos CD4+ e CD8+ (KYDD et al., 1991), juntamente com células plasmáticas, macrófagos e eosinófilos (GRÜNIG et al., 1995) acumulam-se no estroma de suas células.

As células dos cálices endometriais são responsáveis pela produção de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (GINTHER, 1998). O eCG, na sua função endócrina, atua expressando atividades biológicas semelhantes à do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e a do Hormônio Luteinizante (LH) (STEWART et al., 1976). As concentrações séricas de eCG da égua prenhe aumentam rapidamente do dia 40 para os valores variáveis de pico entre 20 – 300 UI/ml durante o período dos dias 50 a 75 de gestação. O seu declínio inicia concomitantemente com o processo degenerativo dos cálices endometriais, por volta do dia 70 (ALLEN, 1969).

Cada cálice representa um pacote de células adjacentes com diferentes genótipos, maternos e fetais. Eles são efetivamente aloenxertos fetais (LUNN et



al., 1997). Os antígenos fetais são estranhos para a égua, resultando em uma das mais marcantes respostas imunológicas entre espécies a partir do influxo de linfócitos contra a gestação (GINTHER, 1998). Mesmo defendendo-se inicialmente, os cálices endometriais passam por um processo degenerativo a partir do ataque do sistema imune, resultando na morte linfomediada dos cálices (ALLEN, 1982).

Entre os dias 40 e 42, após o início da formação dos cálices endometriais, as células trofoblásticas da membrana corioalantóide iniciam uma comunicação microvilosa com as células epiteliais do endométrio da égua (SAMUEL et al., 1975). Após o dia 60 a infiltração das células do componente materno e fetal torna-se cada vez mais extensivamente ramificada, de modo que, por volta do dia 120, a unidade hemotrófica da placenta alantocoriônica, o microplacentoma, é totalmente formado e cobre neste momento toda a superfície interna do útero (BRACHER et al., 1996).

## **2.4 Comunicação materno-embriônica e suas interações imunológicas**

A comunicação entre o feto mamífero e o útero materno durante a prenhez, corresponde a um dos eventos de maior relevância para a pesquisa voltada à reprodução equina, pois determina uma série de eventos relacionados à tolerância imunológica da fêmea ao semi-aloenxerto, como é classificado o feto mamífero. O sucesso da tolerância ao feto contrasta fortemente o que é observado com a falha da maioria dos enxertos de tecidos e órgãos sem a correspondência genética entre doador e receptor (ANTCZAK, 2012).

Estudos associados a este evento em diversas espécies, incluindo os equinos, identificaram complexos mecanismos a partir do efeito de antígenos específicos e não específicos. Estes mecanismos podem ser classificados de três formas: (i) repressão da expressão de aloantígenos de herança paterna, particularmente antígenos ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) pela placenta, (ii) alterações sistêmicas na resposta imune materna durante a gravidez, e (iii) modulação imune local na interface entre placenta e útero (NORONHA; ANTCZAK, 2010).

Os antígenos expressos pelos tecidos embrionários são produtos do MHC dos genes paternos. Os genes do MHC classe I e II são os responsáveis por

codificarem moléculas que estimulam rápidas e potentes respostas imunes mediadas por célula e humoral. Entretanto, pesquisas demonstraram que em animais eutérios a expressão da molécula de MHC pelas células trofoblásticas é reprimida, presumivelmente como uma estratégia para evitar o reconhecimento e a destruição pelo sistema imunológico materno (NORONHA; ANTCZAK, 2010). Os trofoblastos do alantocóron, que compreendem a maior parte da interface feto-maternal, não expressam proteínas do MHC classe I, embora algum mRNA possa ser encontrado (BACON et al., 2002).

Durante uma janela curta do início da gestação, os trofoblastos da cinta coriônica e dos cálices endometriais, expressam uma grande quantidade de antígenos MHC classe I, de origem materna e paterna. A partir do 30º dia de gestação a quantidade expressa de genes MHC classe I pode ser comparável à mesma quantidade encontrada em tecidos linfoides. Permanece alta até pouco depois de as células se diferenciarem por completo em células trofoblásticas dos cálices endometriais, e alcançam níveis quase indetectáveis por volta do 45º dia de gestação (CRUMP, 1987).

As respostas imunes geradas a partir da fêmea gestante trabalham para regular a inflamação a partir de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios. Estes mediadores são classificados como citocinas, proteínas que além de desempenhar a regulação da resposta imune são importantes nas respostas inflamatórias e na hematopoiese. Além disso, apresentam grande importância na atividade celular, migração, contato entre células, proliferação e expressão gênica (SAINI et al., 2011). Estas proteínas podem ser secretadas através de linfócitos Th1 ou Th2. A resposta gerada por linfócitos Th1 tende a um perfil pró-inflamatório, ativando macrófagos e resposta imune mediada por célula. Do outro lado, a resposta gerada por citocinas provenientes de linfócitos Th2 conduzem o sistema imune a uma resposta anti-inflamatória através da diferenciação das células B e da produção de anticorpos (CHAOUAT et al., 1995).

A gestação pode ser comumente nomeada como um “fenômeno Th2” devido à transformação da relação entre as citocinas Th1 (IL-1, IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-4, IL10, IL-13) que ocorre ao longo da gestação (SAITO et al., 2010). Esta alteração tem sido sugerida como um possível mecanismo para sobrevivência fetal (GHAEBI et al., 2017). Diversos trabalhos demonstram a relevância destas proteínas ao longo da gestação, como é o exemplo de

Tachibana et al. (2013), que demonstraram a crescente expressão de IL-4 (Th2) no dia 25 da gestação contrastando com IL-12 (Th1) que apresentou um padrão de expressão decrescente até o dia 25 de gestação. Tanto IL-12 quanto IL-4 desempenham papel importante na modulação da resposta imune frente ao semi-aloenxerto, pois são capazes de induzir linfócitos T CD4+ virgens em linfócitos Th1 e Th2, respectivamente (ANDREW et al., 2001)

A população de linfócitos T reguladores (Treg) durante o período gestacional na mulher é amplamente desenvolvida, seja na circulação sanguínea, ou na interface materno-fetal (FIGUEIREDO, 2016). Esta alteração pode ser percebida também na espécie equina (AURICH et al., 2014). A presença do Treg na interface materno-fetal intervém para regular a reação alo-reativa das células Th1 e Th17, gerando um ambiente favorável para a manutenção da prenhez, visto que o balanço entre Th1/Th2 não é suficiente para impedir o aborto na espécie humana (ALIJOTAS-REIG; LLURBA; GRIS, 2014).

A fim de detalhar a resposta imune da égua durante a gestação, Fedorka e colaboradores (2019), desenvolveram estudos baseados na análise da resposta de Th1, Th2 e Treg durante a gestação. Utilizando amostras da membrana corioalantóide e do endométrio nos dias 45, 120, 180, 300 e 330 de gestação quantificou-se, a partir de qPCR, a expressão de citocinas relacionadas com cada tipo de resposta celular.

Evidenciou-se que a resposta imune dinâmica e adaptativa da égua assemelha-se, em grande parte dos eventos, à da espécie humana. Observou-se o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias na fase inicial da gestação, assim como descrito na espécie humana (MOR et al., 2011). O retorno da predominância da resposta pró-inflamatória se deu novamente ao fim da gestação, porém não foi possível validar a informação devido ao processo de coleta de material para análise.

A população de citocinas anti-inflamatórias do endométrio e do corioalantóide demonstrou crescimento expressivo ao longo do período gestacional da égua, demonstrando perfil similar de crescimento em comparação com as amostras de éguas em diestro (FEDORKA et al., 2019). Acredita-se que o balanço entre a população de linfócitos Th2 pode ser crítico para a manutenção da prenhez, e qualquer mudança nessa população pode condicionar ao aborto (MAKHSEED et al., 2001).

## 2.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos da gestação

As alterações fisiológicas na égua durante a gestação levam a aumentos na demanda corporal, portanto, também resultam em alterações na homeostase do sangue (MORRIS, 1998). A magnitude das variações hematológicas durante a gestação, e a sua compreensão, possibilitam o entendimento de questões fisiopatológicas, tornando-se uma importante ferramenta para o acompanhamento e manejo de fêmeas equinas gestantes (KRAMER, 2000).

Tais mudanças são atribuídas à saúde das éguas e têm sido associadas ao desenvolvimento fetal. Em mulheres, estudos recentes demonstraram a existência de uma relação causa-efeito com certas anormalidades bioquímicas e complicações obstétricas, indicando que as alterações destes valores compensam as necessidades metabólicas da mãe e adaptam-se ao crescimento fetal (GAGNON, 2008).

Faramarzi et al. (2018) demonstraram a partir de um estudo do perfil hematológico de éguas prenhes uma significativa redução na quantidade de células sanguíneas vermelhas, no hematócrito e na hemoglobina, em comparação com éguas não prenhes. O mesmo resultado não foi encontrado em um estudo anterior avaliando-se 16 éguas de tração (AOKI; ISHII, 2012).

A característica de hemodiluição durante a prenhez é um fenômeno muito bem estabelecido na espécie humana. Acredita-se que a redução da viscosidade do sangue esteja relacionada com uma melhora no fluxo sanguíneo para a placenta. Este fenômeno se torna ainda mais importante no fim da gestação pela maior demanda nutricional e de oxigênio gerada pelo feto (CHANDRA et al., 2012).

A contagem de células sanguíneas da linhagem branca não apresentou diferenças significativas durante a gestação, como demonstrado por Faramarzi et al. (2018). Embora Bazzano et al. (2014) tenham demonstrado um crescimento significativo de leucócitos quatro semanas antes do parto, sendo o valor máximo durante o parto, corroborando com os resultados de Orozco et al. (2007) que apresentaram um crescimento de leucócitos a partir da segunda metade da gestação em éguas Brasileiro de Hipismo e Bretão.

O sucesso da gestação está relacionado com uma série de eventos fisiológicos a fim de produzir ajustes nos sistemas cardiovasculares e

metabólicos para se adequar ao aumento do conteúdo uterino e aumentar a disponibilidade de nutrientes ao feto (BUTTE, 2000). As mudanças hormonais de esteróides, peptídeos, prostaglandinas, estrogênios e progesterona decorrentes da gestação resultam em aumento no volume plasmático e na síntese de proteínas plasmáticas. Estas mudanças modulam a capacidade materna de suprir de energia e de nutrientes a unidade feto-placentária. Além disso, essas mudanças têm efeitos sobre a função renal, fluxo hepático e cardiovascular materno, resultando em aumento na demanda metabólica (MORRIS, 1998).W

As características na classificação quanto ao perfil bioquímico durante a gestação apresentam variações em determinadas análises, assim como no perfil hematológico, visto que a demanda metabólica é incrementada. Avaliando o perfil bioquímico do plasma sanguíneo durante toda a gestação de éguas Puro-Sangue Espanhol, Sotué e Montesinos (2013) estabeleceram que, clinicamente, pode ser recomendado o uso de intervalos de referência específicos para os três trimestres de gestação. Essa condição se dá de acordo com determinados eventos hormonais e metabólicos que ocorrem durante o período gestacional da égua. Da mesma forma, Faramarzi et al. (2018) demonstra em seus estudos variações importantes no perfil bioquímico da égua gestante, muitas vezes correlacionadas com padrões vistos na espécie humana.

Os níveis de albumina e ureia durante a gestação da égua apresentam significativa redução durante o segundo trimestre de gestação (FARAMARZI et al., 2018), o que se assemelha ao encontrado no terceiro trimestre de gestação das mulheres, onde os baixos níveis de albumina e ureia, devido à hemodiluição, causam importante decréscimo na pressão oncótica, predispondo à formação de edemas fisiológicos e condições de pré-eclampsia. Os mesmos resultados não foram encontrados por outros autores avaliando-se diferentes raças durante a gestação, como Puro Sangue Espanhol, Brasileiro de Hipismo, Cavalo de Sela Americano, Quarto de Milha (HARVEY et al., 2005; OROZCO et al., 2007)

Avaliando o perfil bioquímico de éguas gestantes e não gestantes das raças Brasileiro de Hipismo e Bretão, Campelo (2008) demonstrou que as concentrações séricas de creatinina, fosfatase alcalina, proteína total, cloro (Cl) e potássio (K+) se mantiveram praticamente inalterados durante a gestação. Os valores da aspartato aminotransferase (AST), albumina, bilirrubinas direta,

indireta e total, sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) mostraram tendência à diminuição, enquanto as concentrações de ureia e de fósforo (P) flutuaram sem um padrão definido durante a gestação.

### 3 ARTIGO

## AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA NA PREENHEZ INICIAL DA ÉGUA.

Leonardo Glaeser Paul<sup>1</sup>, Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2</sup>, Juliana Pereira Matheus<sup>3</sup>, Vanessa Canal<sup>1</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>, Henrique Boll de Araujo Bastos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil;

<sup>2</sup>HISTOREP – Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil;

<sup>3</sup>Laboratório Zelle de Patologia Clínica, Porto Alegre-RS, Brasil.

### 3.1 Resumo

Existe um complexo mecanismo de interação materno-embriônico, que permite uma sequência de eventos exata para que o reconhecimento materno da prenhez, manutenção do corpo lúteo primário e desenvolvimento embrionário ocorra adequadamente. As alterações sistêmicas durante a prenhez na égua têm sido pouco estudadas, porém podem revelar pontos importantes da complexa fisiologia da interação entre o embrião geneticamente diferente e a homeostase materna. Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações envolvendo o sistema imunológico, hematológico e bioquímico na prenhez inicial da égua, associando a eventos essenciais à manutenção da gestação, em um caráter sistêmico de avaliação. Foram coletadas amostras de sangue de 8 éguas cíclicas durante a temporada reprodutiva. As amostras foram coletadas no dia da indução da ovulação (D -2), no 15º dia (D 15), no 25º dia (D 25) e no 45º dia (D 45) pós ovulação. As amostras coletadas através de venopunção jugular foram encaminhadas para a realização de hemograma e avaliação de metabólitos séricos. A técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada para verificar a expressão de *interleucina 4* (IL-4), *fator de necrose tumoral* (TNF- $\alpha$ ) e *receptor de hormônio luteinizante* (RLH). No hemograma, a variável que apresentou diferença significativa entre grupos foram os eosinófilos, que apresentaram um aumento na concentração do D-2 para o D25, e uma diminuição do D25 para o D45. Já os leucócitos segmentados, apresentaram uma redução significativa entre os grupos do D0 e D15. A AST demonstrou uma tendência de aumento entre D0 e D15 e maior concentração no D0 em relação ao D25. A IL-4 apresentou aumento significativo no D15 e D25 em relação ao D-2, acompanhando o padrão dos eosinófilos. Os eosinófilos e os leucócitos segmentados podem ter papel importante no início da gestação, podendo ser reflexo da resposta imune celular ao aloenxerto fetal. Corroborando com os resultados a interleucina-4 confirma o resultado encontrado visto que os

eosinófilos são responsáveis por parte da liberação desta citocina. Concluímos que alterações sistêmicas principalmente os eosinófilos e a IL-4 podem estar alterados seguindo o momento importante de reconhecimento materno e tolerância imunológica, que ocorre durante o período de prenhez inicial.

**Palavras-chave:** reprodução equina, prenhez, embrião.

### 3.2 Introdução

A complexa interação entre o embrião e o ambiente materno traduz a dicotomia em que o sistema imune materno é submetido, de um lado encarregado de evitar infecções a partir de antígenos e de outro submetido à aceitação de antígenos embrionários, fetais e placentários (COLLINS et al., 2009). Durante a gestação diversos efetores e moléculas do sistema imune estabelecem tolerância materna específica em relação ao feto semi-alogênico.

Durante a gravidez em mulheres saudáveis, uma transição de citocinas do tipo predominantemente Th1 para citocinas do tipo Th2 foi observada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), em comparação com mulheres que não estavam grávidas, o que ocorre entre os primeiro e terceiro trimestres de gravidez. A gestação equina parece imitar a gestação humana de várias maneiras, pelo período médio da gestação governado pelas propriedades anti-inflamatórias, precedido por um padrão de expressão de citocinas pró-inflamatória e podendo ser observado novamente ao fim do período gestacional (FEDORKA et al., 2019).

Devido à presença do aloantígeno derivado do pai, a unidade feto-placentária é considerada um aloenxerto que precisa escapar do reconhecimento e destruição pelo sistema imune materno (ALUVIHARE et al., 2004). Esta condição é chamada de tolerância materna do conceito (ALUVIHARE et al., 2004; NORONHA; ANTCZAK, 2010; ANTCZAK, 2012). A redundância envolvendo os mecanismos de proteção gerados pelo sistema imune da fêmea gestante ajudam a garantir a transmissão de vida de geração em geração, tornando a tolerância imunológica um rico campo de desenvolvimento científico (ANTCZAK, 2012).

As citocinas são potentes mediadores celulares que regulam as respostas imunológicas, parte delas ativam respostas inflamatórias e são denominadas em conjunto pró-inflamatórias, mediada por linfócito Th1 como é o exemplo do fator



de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Enquanto outras atenuam esse processo e são denominadas de anti-inflamatórias, mediadas por linfócitos Th2 como é o exemplo da interleucina 4 (IL-4) (MOSMANN et al., 1989). O desequilíbrio na produção dessas moléculas está frequentemente associado à fisiopatologia de doenças reprodutivas, como falhas de implantação e perdas fetais em mulheres (RAGHUPATHY et al., 2001).

As perdas gestacionais nos primeiros dias de gestação são caracterizadas como a principal causa para baixos índices reprodutivos. Independentemente da idade da égua, a maioria das perdas gestacionais ocorrem até o 35º dia de gestação (MORRIS; ALLEN, 2002). Dentre as possíveis causas, defeitos morfológicos, inadequado crescimento embrionário e sinalização embrionário deficiente para posterior reconhecimento materno da gestação (BERGFELT; WOODS; GINTHER, 1992). Neste contexto, Aurich e colaboradores (2014) demonstraram que éguas que apresentavam baixos níveis de linfócitos T reguladores apresentavam maior incidência de perdas embrionárias, apresentando a forte interação do sistema imune com o reconhecimento materno da gestação antes mesmo do contato do sêmen com o útero.

A atribuição de novas funções aos eosinófilos, além da notória capacidade de resposta contra helmintos, é um dos exemplos da capacidade de diferentes células do sistema sanguíneo gerarem respostas frente a acontecimentos não identificados anteriormente. A capacidade de processar antígenos, estimular células T e promover respostas humorais por meio de interações com células B, são novas atribuições descritas aos eosinófilos (RAVIN; LOY, 2006). Da mesma forma, a presença de leucócitos no útero de primatas e porcas durante o período de implantação sugere que macrófagos desempenhem um papel de reconhecimento do tecido fetal pelo sistema imune e talvez desempenhe um papel de suporte no desenvolvimento placentário (WHYTE; BINNS, 1994; SLUKVIN; BREBURDA; GOLOS, 2004)

As alterações hematológicas e bioquímicas durante a gestação da égua têm sido amplamente pesquisadas (HARVEY et al., 2005; OROZCO et al., 2007; CAMPELO, 2008; AOKI, 2012; SOTUÉ, MONTESINOS, 2013; BAZZANO et al., 2014; FARAMARZI et al., 2018). Estas pesquisas estão voltadas principalmente às desordens clínicas, buscam avaliar o período gestacional completo, o

periparto da égua e também o puerpério. Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações envolvendo o sistema imunológico, hematológico e bioquímico na prenhez inicial da égua, associando a eventos essenciais à manutenção da gestação.

### **3.3 Materiais e Métodos**

#### **3.3.1 Animais**

O presente estudo foi realizado durante a temporada reprodutiva no hemisfério sul em cidades da região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil (27°12'51" S, 49°38'35" O). As amostras de sangue foram coletadas de 8 éguas, em quatro momentos diferentes, todas sob manejo extensivo de criação, pastagem nativa e água *ad libitum*. A idade média das éguas variou de 6 a 15 anos de idade. No princípio da avaliação, todas as éguas foram submetidas a exame clínico e exame ginecológico baseado em palpação retal e exame ultrassonográfico do trato reprodutivo. As fêmeas classificadas como clinicamente saudáveis e aptas à reprodução deram seguimento ao estudo. Este trabalho foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (protocolo número 43034).

#### **3.3.2 Desenho experimental**

Após avaliação inicial as éguas eram submetidas a palpação retal e análise ultrassonográfica rotineiramente para identificação de estro. Quando identificado folículo ovariano  $\geq 35\text{mm}$  de diâmetro e edema uterino realizava-se a indução da ovulação a partir da administração de 250  $\mu\text{g}$  de Acetato de Histrelina (STRELIN®, Botupharma). No dia subsequente a inseminação artificial com sêmen refrigerado era realizada. Após 48 horas da aplicação do indutor de ovulação a avaliação reprodutiva da fêmea era realizada na intenção de confirmar a ovulação e identificar a presença ou não de líquido intrauterino. O momento da indução da ovulação representava o dia -2 (48 horas antes da ovulação) do experimento, onde o dia zero representaria o momento da ovulação. Todas as éguas do presente estudo ovularam dentro do prazo estipulado, obedecendo o prazo determinado para ser classificado como dia

zero. Após 15 dias da confirmação da ovulação, o diagnóstico de gestação era realizado e era realizada uma coleta de sangue. No dia 25 e 45 de gestação as éguas passavam por nova avaliação reprodutiva e coleta de sangue. Constituindo assim os grupos analisados, que representam os dias da indução da ovulação (D -2), o dia do diagnóstico de gestação (D 15) e fixação embrionária, dissolução da cápsula embrionária (D 25) e início da fase fetal e presença dos cálices endometriais (D 45). Imediatamente após a coleta das amostras, o sangue era encaminhado aos laboratórios.

### 3.3.3 Coleta e manipulação das amostras

Foi realizado quatro colheitas de sangue periférico, através de venóclise jugular das éguas. Foram coletadas três amostras do sangue periférico, uma para realização de qPCR, foi coletada em tudo de Heparina (10ml). A segunda amostra foi coletada em tubos contendo EDTA para a realização de da análise hematológica (4ml), e a terceira amostra foi coletada em tubos sem anticoagulante para realização do perfil bioquímico (4ml). Todos os tubos foram transportados sob refrigeração até o laboratório para o processamento.

O hemograma, leucograma e bioquímico foi realizado junto ao Laboratório Zelle de Patologia Clínica, na cidade de Porto Alegre, RS. O qPCR foi realizado junto ao REPROLAB – UFRGS.

### 3.3.4 Extração e transcrição reversa do RNAm

As amostras coletadas em tubo contendo heparina e acondicionadas em recipiente de isopor, permaneciam refrigeradas até a chegada ao Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB), onde iniciava-se o isolamento do RNAm dos leucócitos através de kit comercial SV Total RNA Isolation (Promega). Após a extração o RNAm foi quantificado por medição fotométrica (NanoDrop, Thermo Scientific®). A transcrição reversa do RNAm em cDNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial GoSCRIPT Reverse Transcription Mix, (Promega).

### 3.3.5 PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

Para a quantificação relativa da abundância dos transcritos foram conduzidos ensaios de qPCR. A amplificação de cDNA foi realizada com

intercalante fluoróforo SYBR Green Master Mix™ (Thermo Fisher Scientific). O perfil do programa utilizado para a amplificação foi 95°C por 2 minutos no sistema Eco™ Real-Time PCR System (Illumina®) seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento e extensão por 45 segundos. O cálculo comparativo da expressão relativa de mRNA das amostras foi realizada com “cycle threshold” (CT) dos genes alvos através da fórmula ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). A quantificação dos genes alvo foi obtida utilizando primers específicos de equinos para TNF- $\alpha$ , IL-4 e receptor de LH (RLH). O gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado para realizar a normalização dos dados. Todas as reações foram realizadas em duplicata e o controle negativo foi incluído em todas as análises. Os primers de amplificação foram obtidos da Integrated DNA Technologies (IDT). As referências das sequências de primers utilizadas estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência de primers utilizados para expressão gênica através de qPCR.

Gene	Sequência de Primer (5'- 3')	Referências
PF <i>RLH</i> PR <i>RLH</i>	CCA CAA CTG ATA GCT ACC AAC AAA G TGC AGG TGA AAT CGG TGAA G	(HERRERA-LUNA; BUDIK; AURICH, 2012)
PF <i>IL4</i> PR <i>IL4</i>	CAA AAC GCT GAA CAA CCT CA CTG TTG AAG CAC CTT TGC AG	(SÁNCHEZ-MATAMOROS et al., 2013)
PF <i>TNF-<math>\alpha</math></i> PR <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	GCT CCA GAC GGT GCT TGT G GTG AAA CCC CAC TAG CCG	(RIIHIMÄKI et al., 2008)
PF <i>GAPDH</i> PR <i>GAPDH</i>	GAT TGT CAG CAA TGC CTC CT GGT CTT GTA GTA GGG ACG AA	(COYNE et al., 2009)

Abreviaturas: PF: primer forward, PR: primer reverse. RLH: receptor de hormônio luteinizante. IL4: interleucina -4. TNF: fator de necrose tumoral. GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

### 3.3.6 Análise sanguínea e bioquímica

Ao chegarem ao laboratório, as amostras sanguíneas eram encaminhadas ao homogeneizador e eram homogeneizadas várias vezes antes de serem submetidas a qualquer análise. Após, cada amostra era submetida a técnica do micro hematócrito, consiste em centrifugar uma alíquota do sangue

em capilar, para determinação de hematócrito, através de leitura em régua de hematócrito, para conferência de parâmetro também realizado em analisador hematológico automático, além de fornecer a oportunidade de avaliar anormalidades quanto a coloração do plasma, dosagem de fibrinogênio e proteína plasmática total, por refratometria, servindo ainda, para visualizar a capa leucocitária (KERR, 2003; REBAR et al., 2003).

A dosagem de hemoglobina, contagem de eritrócitos e contagem de leucócitos totais foi realizada de maneira automatizada, com a utilização do contador eletrônico de células poch Sysmex 3Diff®. Após, realizaram-se esfregaços sanguíneos em lâmina, para posterior coloração e contagem diferencial de leucócitos. A contagem específica ou diferencial era feita pelo exame microscópico do esfregaço sanguíneo. Os leucócitos eram identificados e registrados no totalizador eletrônico até atingir 100 células, obtendo assim valores relativos, que permitem obter os valores absolutos (ALMEIDA; SILVA, 1995).

As amostras para exames bioquímicos, após retração do coágulo, foram centrifugadas e o soro utilizado para mensuração de analitos específicos. Os bioquímicos foram mensurados pelo método colorimétrico-cinético/enzimático, de acordo com a técnica específica para cada analito, utilizando-se kits comerciais LABTEST® e analisador bioquímico automático Labmax 240, LABTEST®. Os bioquímicos séricos analisados foram aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total, bilirrubina direta, albumina, fosfatase alcalina (FA), cálcio total, fósforo, creatinina, ureia e proteína sérica total. As técnicas utilizadas para cada um dos exames bioquímicos específicos seguiram as instruções dos fabricantes.

As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por cinco minutos e, após sinérese, o soro obtido foi acondicionado em tubos do tipo eppendorfs, identificados e armazenados adequadamente (-20°C) até o momento das determinações. O íon cloreto (Cl<sup>-</sup>) foi analisado com o auxílio de reagentes para diagnóstico Labtest e posterior leitura espectrofotométrica. As determinações das concentrações séricas de sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) foram realizadas com o auxílio de conjunto de reagentes para diagnóstico e leituras em Seletor de íons. A determinação da análise de AST, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, proteína total, bilirrubina, albumina, cálcio e fósforo, foi realizada utilizando um conjunto

de reagentes Labtest específicos, seguindo-se rigorosamente as instruções contidas nos mesmos. As leituras foram realizadas por meio de espectrofotômetro.

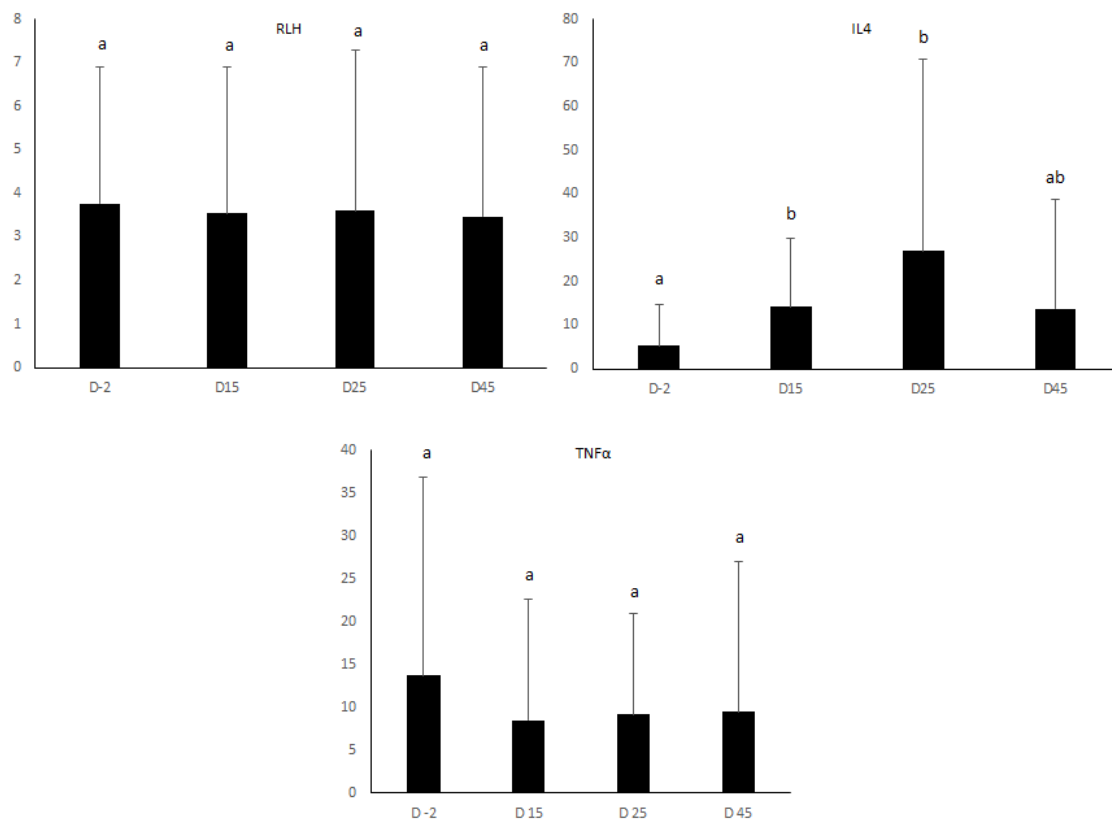
A concentração de globulinas foi efetuada no soro, calculando-se a diferença entre os valores de proteína total e albumina. Para a avaliação do fibrinogênio as amostras foram acondicionadas em tubos contendo citrato de sódio 3,8% (20 mg/mL) e analisadas imediatamente após a colheita, de acordo com o procedimento cronométrico, com auxílio de conjunto de reagentes (Wiener) e posterior leitura em analisador específico.

### 3.3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software Statistix 8, a avaliação da normalidade dos dados foi realizada com o teste de Shapiro-Wilks. Os dados estão demonstrados com a média  $\pm$  o desvio padrão. Os quatro grupos experimentais (D -2, D 15, D 25 e D 45) foram considerados variáveis independentes e os constituintes do hemograma, leucograma, bioquímico e a expressão dos genes (*IL4*, *TNF- $\alpha$*  e *RLH*) foram considerados variáveis dependentes. Para as variáveis dependentes que apresentarem distribuição paramétrica, foi realizada uma análise de Variância (ANOVA), seguida do teste T – Tukey post hoc para localizar as diferenças. Para as variáveis dependentes que apresentaram distribuição não paramétrica foi realizada a análise com o Teste de Kruskal-Wallis. Foram consideradas diferenças significativas as comparações que demonstrarem o  $P \leq 0.05$  e valores de P entre  $> 0,05$  e  $\leq 0.1$  foram consideradas tendências. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para verificar as relações existentes entre as variáveis dependentes. A correlação foi avaliada de acordo com o valor de r e  $P \leq 0,05$ . Valores entre 0,40 e 0,60 foram considerados como correlações de moderada intensidade, valores  $>0,60$  foram considerados com forte intensidade de correlação

### 3.4 Resultados

No presente estudo, a expressão gênica da *interleucina 4* (IL-4) apresentou maior abundância nos dias 15 e 25 em relação ao dia -2. Já a expressão de *TNF- $\alpha$*  e de *receptor de LH* não apresentaram diferenças estatísticas ao longo dos dias avaliados (Figura 1).



**Figura 1.** Quantificação relativa (QR) da expressão gênica ( $\pm$  DP) de RLH, IL4 e TNF- $\alpha$  no sangue periférico de éguas no dia da indução da ovulação (-2) e nos dias 15, 25 e 45 de prenhez. <sup>ab</sup> Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05).

No eritrograma, as variáveis analisadas (Tabela 2), em geral, não apresentaram diferenças estatísticas entre os dias avaliados, sendo possível observar tendências estatísticas entre os dias em algumas delas. Já no leucograma (Tabela 3) as variáveis eosinófilo, leucócitos segmentados e plaquetas totais apresentaram diferenças significativas entre os dias avaliados (Figura 2). O eosinófilo apresentou aumento significativo no dia 25 em relação aos dias -2 e 45. Já os leucócitos segmentados apresentaram uma redução no dia 15 em relação a todos outros dias avaliados. As plaquetas totais apresentaram redução significativa no dia 25 em relação ao dia -2. No

bioquímico (Tabela 4), apenas as variáveis bilirrubina total, aspartato aminotransferase (AST) e fibrinogênio apresentaram diferenças estatísticas entre os dias avaliados (Figura 4). Para a bilirrubina, a redução foi constante, apresentando diferença significativa apenas entre os dias -2 e 45. Já a AST a diferença ficou entre os dias -2 e 25, com um significativo acréscimo nos valores do dia 25. O fibrinogênio apresentou-se elevado no dia 25 em relação aos dias -2 e 45.

**Tabela 2:** Média dos valores referentes ao eritrograma dos grupos avaliados com seus respectivos valores de referência. (\*,#) Sinais semelhantes demonstram tendência estatística entre os dias avaliados.

Eritrograma	Valores de Referência	D-2 (DP)	D15 (DP)	D25 (DP)	D45 (DP)
Hemácias	6,8 – 11,9 x 10 <sup>6</sup> /µl	7,42625* (1,05)	6,72125 (0,79)	7,245 (0,76)	6,59375* (0,66)
Hemoglobina	11,0 – 19,0 g/dl	11,0375* (1,22)	10,4475 (1,74)	10,94875 (1,29)	10* (0,96)
Hematócrito	32 – 53%	34,5 (4,34)	32,5 (4,30)	33,75 (3,69)	32,625 (3,33)
V.C.M.	37 – 58,5 %	46,575*# (1,69)	48,3125* (1,92)	47,3375 (2,21)	49,5875# (3,86)
C.H.C.M.	31 – 37%	32,1375 (1,15)	32,375 (1,75)	32,0375 (0,76)	31,4375 (1,29)
PPT	5,6 – 8,8 g/dl	7,3 (0,95)	7,5 (0,86)	7,925 (0,96)	7,6 (0,84)

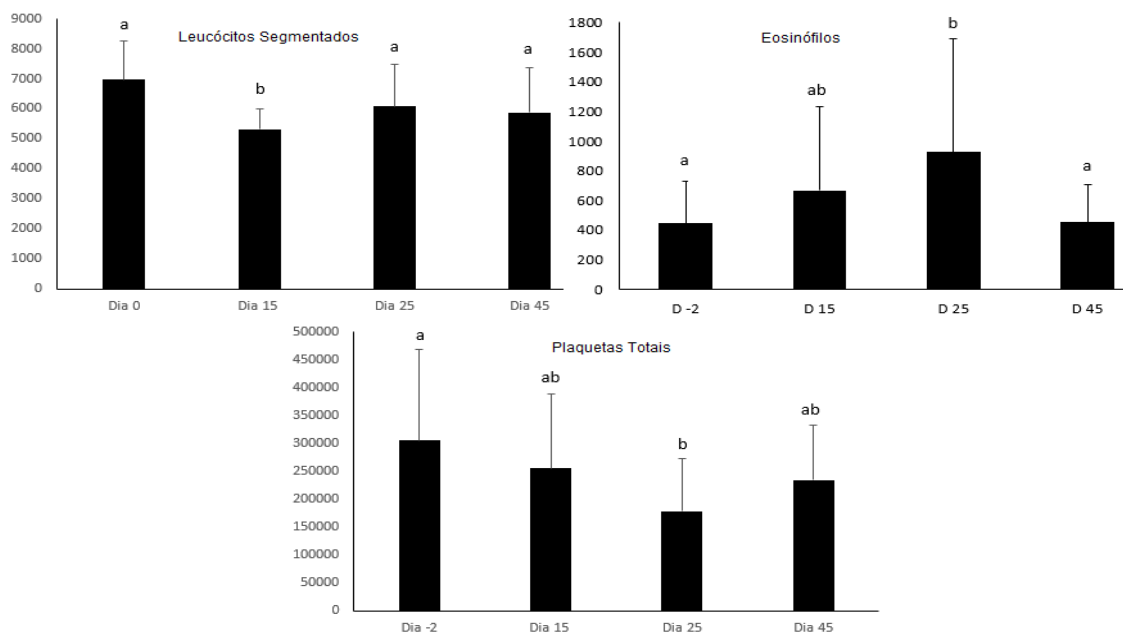
Abreviaturas: (DP) Desvio Padrão



**Tabela 3:** Média dos valores referentes ao leucograma dos grupos avaliados com seus respectivos valores de referência. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.

Leucograma	Valores de Referência	D-2 (DP)	D15 (DP)	D25 (DP)	D45 (DP)
Leucócitos Totais	5.400 - 14.300 / $\mu$ l	11450 (3042,55)	9750 (2001,42)	11487,5 (3026,75)	10475 (2721,21)
Leucócitos Segmentados	2.260 - 8.580	6978,125 <sup>a</sup> (1275)	5314,875 <sup>b</sup> (674,27)	6083,375 <sup>a</sup> (1393,93)	5869 <sup>a</sup> (1516,91)
Linfócitos	1.500 - 7.700	3641 (1669,76)	3482,75 (1485,63)	3975,875 (1488,79)	3895,625 (2004,74)
Monócitos	0 - 1.000	383 (397,48)	376,75 (400,86)	475,25 (385,19)	340,625 (326,80)
Eosinófilos	1 - 1.000	443,75 <sup>a</sup> (288,69)	665,125 <sup>ab</sup> (565,92)	926,75 <sup>b</sup> (764,47)	452,25 <sup>a</sup> (320,05)
Basófilos	Raros	38,375 (53,04)	50,125 (76,74)	14 (37,04)	33 (93,33)
Plaquetas Totais	100.000 - 350.000 / $\mu$ l	305375 <sup>a</sup> (163435,4)	255857,14 <sup>ab</sup> (134129,8)	179500 <sup>b</sup> (93491,02)	234875 <sup>ab</sup> (98063,3)

Abreviaturas: (DP) Desvio Padrão

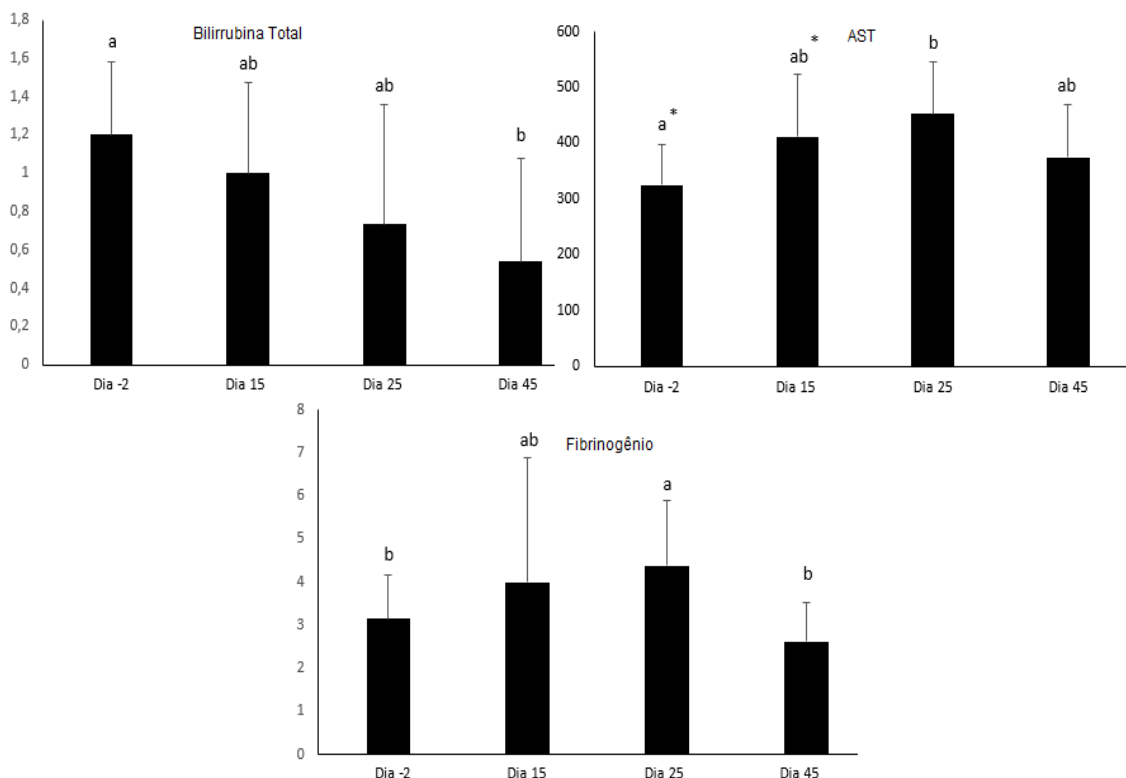


**Figura 2:** Demonstração gráfica das variáveis do leucograma que apresentaram diferenças estatísticas entre os dias da indução da ovulação (-2) e os dias 15, 25 e 45 de prenhez. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.

**Tabela 4:** Média dos valores referentes ao bioquímico dos grupos avaliados com seus respectivos valores de referência. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos. (\*) representa tendência estatística.

Bioquímico	Valores de Referência	D-2 (DP)	D15 (DP)	D25 (DP)	D45 (DP)
Bilirrubina Direta	0 a 0,40 mg/dL	0,3475 (0,12)	0,36375 (0,06)	0,31625 (0,10)	0,27375 (0,08)
Bilirrubina Total	1,0 - 2,0 mg/dL	1,2 <sup>a</sup> (0,38)	1 <sup>ab</sup> (0,47)	0,73375 <sup>ab</sup> (0,62)	0,58375 <sup>b</sup> (0,53)
Aspartato Aminotransferase	< 366 U/L	324,94875 <sup>a*</sup> (73,13)	411,905 <sup>ab*</sup> (111,03)	451,95625 <sup>b</sup> (93,63)	374,33125 <sup>ab</sup> (93,95)
Albumina	2,60 - 3,70 g/dL	2,33333(0,19)	2,25875 (0,23)	2,36375 (0,26)	2,405 (0,19)
Cálcio Total	11,2 - 13,6 mg/dL	10,69 (1,58)	10,335 (0,99)	9,79875 (0,97)	9,86625 (1,05)
Creatinina	1,20 - 1,90 mg/dL	1,23142 (0,31)	1,10625 (0,28)	1,23125 (0,35)	1,075 (0,25)
Fosfatase Alcalina	< 395 U.I./L	279,53571 (72,55)	336,72875 (75,09)	337,255 (88,85)	325,78714 (107,07)
Fibrinogênio	2,0- 4,0 g/L	3,14285 <sup>b</sup> (1,57)	4 <sup>ab</sup> (2,77)	4,375 <sup>a</sup> (1,40)	2,625 <sup>b</sup> (1,06)
Fósforo	3,10 - 5,60 mg/dL	4,26 (0,95)	5,28875 (1,49)	4,295 (0,77)	4,93125 (1,53)
Proteínas Totais	5,20 - 7,90 g/dL	12,99428 (16,14)	7,6425 (0,84)	8,315 (1,15)	8,055 (1,12)
Ureia	21 - 51 mg/dL	38,61428 (20,91)	44,20375 (12,54)	39,8625 (7,96)	40,69333 (6,09)

Abreviaturas: (DP) Desvio Padrão



**Figura 3:** Demonstração gráfica das variáveis bioquímicas que apresentaram diferenças estatísticas entre os dias da indução da ovulação (-2) e os dias 15, 25 e 45 de prenhez. Diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.

### 3.5 Discussão

A pesquisa avaliando o sangue periférico no momento inicial da gestação equina, objetivou apresentar as principais alterações sistêmicas associando a eventos essenciais à manutenção da gestação. Tendo em vista a avaliação da possível influência sistêmica de eventos restritos ao ambiente uterino, foi possível confirmar que a gestação inicial é capaz de gerar alterações a níveis sistêmicos de avaliação, seja em um caráter imunológico, hematológico ou bioquímico.

Com a intenção de analisar padrões de respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias optou-se pela escolha de genes representativos. Os resultados referentes a expressão da IL4 na presente pesquisa demonstram um significativo acréscimo nos dias 15 e 25 em relação ao dia -2, representando éguas cíclicas. Na avaliação da expressão gênica de éguas cíclicas e de éguas nos dias 4 e 8 de gestação, foi observado que a concentração de IL4 não apresentou diferença significativas entre os dias avaliados a partir de amostras de sangue periférico

(KURAR et al., 2011). Este resultado, apesar de discordar da avaliação desta pesquisa, não pode ser utilizado como comparação por não se tratar dos mesmos dias de avaliação. Já em amostras de endométrio de éguas prenhes nos dias 13, 19 e 25 um aumento significativo da expressão de IL4 no dia 25 comparado a éguas cíclicas foi identificado (TACHIBANA et al., 2013), o que corrobora com os dados da presente pesquisa onde.

De acordo com Andrew et al. (2001) a interleucina 4 tem a capacidade de induzir a transformação de linfócitos CD4+ virgens em linfócitos do tipo Th2. A produção de IL4 está relacionada com uma variedade de tipos de células. Como mastócitos, basófilos e eosinófilos que desempenham papel importante na liberação desta citocina, (BROWN; HURAL, 1997) o que corrobora com os dados do presente estudo, onde a maior expressão de IL-4 foi no grupo D25 assim como na análise quantitativa dos eosinófilos. Fato semelhante foi descrito por Ekerfelt et al. (1997), quando demonstrou a significativa secreção da IL4 no segundo e terceiro trimestre de gestação na mulher, corroborando com o desvio imunológico a padrões Th2, sugerindo a proteção ao feto contra a sua rejeição.

Descrito primeiramente por Paul Ehrlich em 1879 (GLEICH, 2013), o eosinófilo foi considerado por muitos anos uma célula efetora terminal associada a infecções por helmintos e causadora de dano tecidual. Porém, atualmente sabe-se que o eosinófilo atua em diferentes frentes sendo capaz de interferir na imunidade inata e adaptativa, desempenhando papel importante na imunomodulação (RAVIN; LOY, 2016). Em condições normais, o eosinófilo é encontrado no timo, trato gastrointestinal, útero e glândula mamária. Liberado pela medula óssea, possui meia vida de 18 horas, permanecendo pouco tempo na corrente sanguínea, porém boa parte migra aos tecidos referenciados podendo permanecer ativo por até duas semanas (BLANCHARD; ROTHENBERG, 2009). Em condições inflamatórias linfócitos Th2 ativado produzem citocinas incluindo IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas regulam positivamente a produção de quimiocinas envolvidas no tráfego de eosinófilos: eotaxinas, RANTES (células T normais expressas e secretadas reguladas após ativação) e MCPs (proteína quimiotática para macrófagos) (HOGAN et al., 2008). Na presente pesquisa foi demonstrado que a IL4 e os eosinófilos possuem um

comportamento semelhante, o que pode sugerir um predomínio Th2 na resposta ao embrião e assim sua sobrevivência como visto em outras espécies animais.

Evidências demonstram o complexo papel que os eosinófilos desempenham na imunidade do hospedeiro. Semelhante aos neutrófilos, os eosinófilos podem fagocitar materiais estranhos, incluindo bactérias, leveduras e parasitas, embora apresentem desempenho menos eficiente (SHAMRI; XENAKIS; SPENCER, 2011). Ademais, uma nova visão a respeito dos eosinófilos e da sua capacidade de interferência na imunidade adaptativa do hospedeiro vêm sendo apreciada. Processar antígenos, estimular células T e promover respostas humorais por meio de interações com células B, são novas atribuições dos eosinófilos (RAVIN; LOY, 2006). Dessa forma é plausível associar o eosinófilo como agente relevante na resposta imune celular. Visto que sua concentração foi crescente até o D25 da prenhez, período em que se pode observar grande interação materno-embriônica com o sistema imune, tal qual envolvendo por exemplo, o processo de dissolução da cápsula embrionária. Tais características, como o tempo de permanência do eosinófilo na corrente sanguínea exaltam a relevância desta célula durante tal período, gerando a hipótese de que sua concentração nos tecidos alvo tendem a ser mais expressivas.

Embora a redução do D -2 em relação ao D 15 de gestação associada aos leucócitos segmentados ainda esteja dentro dos padrões de referência para a espécie equina, uma série de informações a respeito do papel dos leucócitos em relação à gestação foi descrita por Whyte e Binns (1994) que relataram a presença de leucócitos durante o período de implantação do blastocisto (dia 14 até 30 após a ovulação) em porcas. Estes leucócitos foram observados majoritariamente na forma intra-epitelial em associação com as glândulas endometriais e em menor quantidade no epitélio luminal. O mesmo aumento na população uterina de leucócitos foi apresentado avaliando primatas. O estudo sugere que os macrófagos presentes no útero possam desempenhar um papel de reconhecimento do tecido fetal pelo sistema imune e talvez desempenhe um papel de suporte no desenvolvimento placentário (SLUKVIN; BREBURDA; GOLOS, 2004). Respeitando as variações entre espécies, seja por diferentes formas de placentação ou mesmo por diferentes períodos de implantação do blastocisto, parece que o influxo de leucócitos para o útero da égua esteja

presente e essa variação negativa na concentração dos leucócitos periféricos esteja relacionada a este processo.

Semelhante aos leucócitos as plaquetas, com o avanço nos dias de prenhez apresentaram uma diminuição de concentração no D25 em relação ao D -2. O'Neill (1985) demonstrou que a injeção de meio de cultura de embriões em útero de ratas esplenectomizadas induzia significativa trombocitopenia dose dependente. Esta trombocitopenia é gerada em ratas por fatores ativadores de plaquetas produzidos pelo ovócito fertilizado. O aumento das concentrações deste fator ativador de plaquetas no período pré-implantação e a significativa diminuição no dia da implantação do blastócito em coelhas, sugerem que este potente autocóide inflamatório pode desempenhar papel vital na implantação (ANGLE et al.,1988).

As pesquisas avaliando perfis hematológicos e bioquímicos em éguas prenhes tem como objetivo apresentar e padronizar intervalos de confiança para componentes do sangue e do plasma. Avaliando-se diferentes períodos e diferentes raças o foco principal é a sua utilização clínica, visto que os clínicos carecem de informações confiáveis e medidas válidas de hematologia e bioquímica em éguas ao longo da gestação (FARAMARZI et al., 2018). Em ampla maioria, os estudos avaliam principalmente os períodos de periparto, pós-parto e primeiros meses de aleitamento (HARVEY, 1994; HARVEY, 2005; AOKI; ISHII, 2012; MARIELLA, 2014). A partir dos analitos bioquímicos, (SATUÉ; MONTESINOS, 2013; HARVEY, 2005; MILINKOVIĆ-TUR et al., 2005) avaliaram o período completo da gestação mensalmente, sendo os dois últimos avaliando adicionalmente os 4 primeiros meses de pós-parto. Em nosso estudo buscamos dividir os grupos, de acordo com os momentos relevantes da fisiologia reprodutiva da égua durante o período de prenhez inicial, desta forma relacionar todos os dados estudados.

Harvey et al. (2005) demonstraram que as concentrações de aspartato aminotransferase (AST) foram significativamente maiores nos primeiros meses de gestação e no aleitamento em comparação com o período médio e final da gestação. Porém não apresentou diferenças significativas quando comparado com o grupo de referência não gestante e não lactante. Resultado semelhante foi encontrado por Satué e Montesinos (2011) demonstrando significativa redução na concentração de AST do primeiro terço gestacional para o terço final.

Estes resultados corroboram em parte com os resultados encontrados, visto que a concentração de AST apresenta uma tendência de crescimento no D15 em comparação ao D-2 e apresenta crescimento significativo no dia D25 em relação ao D-2.

Comparando os resultados das concentrações de bilirrubina total com o que foi encontrado por Harvey e colaboradores (2005) podemos identificar informações contrastantes, provavelmente decorrente das diferenças entre os grupos das diferentes pesquisas. Os valores de bilirrubina no presente estudo apresentam-se em decréscimo, apresentando diferença significativa do dia 45 em relação ao dia -2. Para Harvey e colaboradores os valores iniciam, após o primeiro mês de avaliação, um crescimento até basicamente o parto, onde retornam a valores próximos ao encontrado no primeiro mês de gestação.

O crescimento gradual da concentração de fibrinogênio durante os primeiros dias avaliados, apresentando aumento no D25 em relação ao D-2 e D45, é similar ao padrão encontrado por Klein e Troedsson (2011) quando avaliaram a expressão gênica do embrião equino nos dias 8, 10, 12 e 14 após o dia da ovulação. Apresentando menor expressão no dia 8 em comparação com os dias subsequentes em um padrão crescente, a expressão das subunidades alfa, beta e gama do fibrinogênio foram semelhantes. Em humanos, o fibrinogênio materno desempenha um papel de suporte à gestação mantendo o balanço hemostático e estabilizando a ligação uteroplacentária através das camadas fibrinóides (IWAKI; CASTELLINO, 2005), esta função pode ser observada também nos ratos (IWAKI et al., 2002). Posteriormente Grant et al. (2020) sugeriram que a relação do fibrinogênio na gestação equina pode ser associada à ligação placentária, em um modo dependente de integrinas, por estar presente durante toda gestação na interface materno-fetal. Tais resultados podem estar correlacionados com o aumento das concentrações de fibrinogênio encontrados no sangue periférico das éguas avaliadas no presente estudo.

### **3.6 Conclusão**

Este trabalho demonstra a expressão gênica de *interleucina-4* durante diferentes momentos do desenvolvimento embrionário, assim, sugere-se que esta interleucina possa desempenhar papel importante na imunomodulação

materno-embriónica. Da mesma forma, o eosinófilo, pode ser avaliado como importante componente imune no reconhecimento materno da gestação.



#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo pode demonstrar as principais alterações apresentadas pela égua prenhe nos primeiros dias de gestação no âmbito sanguíneo. Evidenciou dados à pesquisa da reprodução equina que podem, de alguma maneira, auxiliar na identificação de possíveis mecanismos causadores de redução da fertilidade e, quiçá, contribuir com a identificação do mecanismo responsável pelo reconhecimento materno da prenhez na égua.

Os valores encontrados para diferentes componentes do sangue periférico e plasma sanguíneos na presente pesquisa geram informações inéditas para o seguimento das pesquisas com foco na imunomodulação materno-embriônica. Os mecanismos de atuação da maioria dos componentes encontrados ainda precisam ser elucidados, necessitando assim, que mais pesquisas sejam realizadas para esclarecer e aumentar a compreensão de processos fundamentais do reconhecimento materno da gestação na égua.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIJOTAS-REIG, J.; LLURBA, E.; GRIS, J. M. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 241-248, 2014.

ALLAN, F. A landscaping analysis of working equid population numbers in LMICs, with policy recommendations. **Brooke/University of Edinburgh**, 2021. Disponível em: [https://www.thebrooke.org/sites/default/files/Images/Equid\\_Population\\_Landscaping\\_Analysis.pdf](https://www.thebrooke.org/sites/default/files/Images/Equid_Population_Landscaping_Analysis.pdf). Acesso em 09/08/2023.

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

ALLEN, W. R. Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 31, p. 57, 1982.

ALLEN, W. R. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v. 43, n. 4, p. 593-598, 1969.

ANDREW, D. P. et al. CC chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. **The Journal of immunology**, v. 166, n. 1, p. 103-111, 2001.

ANTCZAK, D. F. T-cell tolerance to the developing equine conceptus. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 376-383, 2012.

ALMEIDA, M. A. Z.; SILVA, N. M. Determinação dos valores hematológicos normais do cavalo (*Equus caballus*, Linnaeus) da raça Crioula. **A Hora Veterinária**, v.15, n.87, p.48-50, 1995.

ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Tolerance, suppression and the fetal allograft. **Journal of molecular medicine**, v. 83, p. 88-96, 2004.

ANGLE, M. J. et al. Platelet-activating factor in the rabbit uterus during early pregnancy. **Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 711-722, 1988.

AOKI, T.; ISHII, M. Hematological and biochemical profiles in peripartum mares and neonatal foals (heavy draft horse). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 3, p. 170-176, 2012.

AURICH, C. et al. Low levels of naturally occurring regulatory T lymphocytes in blood of mares with early pregnancy loss. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 6, p. 827-833, 2014.

AURICH, C.; BUDIK, S. Early pregnancy in the horse revisited—does exception prove the rule? **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2015.

BACON, S. J.; ELLIS, S. A.; ANTCZAK, D. F. Control of expression of major histocompatibility complex genes in horse trophoblast. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1612-1620, 2002

BASTOS, H. B. A. et al. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224-235, 2019.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 6, p. 412-420, 1997.

BAZZANO, M. et al. Physiological adjustments of haematological profile during the last trimester of pregnancy and the early post partum period in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3-4, p. 199-203, 2014.

BERGFELT, D. R.; WOODS, J. A.; GINTHER, O. J. Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. **Reproduction**, v. 95, n. 2, p. 339-347, 1992.

BETTERIDGE, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 92-100, 1989.

BLANCHARD, C.; ROTHENBERG, M. E. Biology of the eosinophil. **Advances in immunology**, v. 101, p. 81-121, 2009.

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

BROWN, M. A.; HURAL, J. Functions of IL-4 and control of its expression. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 17, n. 1, 1997.

BUTTE, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1256S-1261S, 2000.

CAMPELO, J. A. C. de S. **Perfil bioquímico sérico de éguas gestantes e não gestantes das raças brasileiro de hipismo e bretão**. 2008. Tese de Doutorado. UNESP.

CHANDRA, S. et al. Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. **Indian journal of hematology and blood transfusion**, v. 28, p. 144-146, 2012.

CHAOUAT, G. et al. Immuno—endocrine interactions in early pregnancy. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl\_2, p. 55-58, 1995.

Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy pp 2–26 Eds GEWement, v. 35, p. 379-388, 1987.

COLE, H. H. et al. The development and hormonal content of fetal horse gonads. **The Anatomical Record**, v. 56, n. 3, p. 275-293, 1933.

COLE, H. H.; GOSS, H. The source of equine gonadotropin. In '**Essays in Biology in Honor of Herbert M Evans**'. (Ed. HH Cole.) p. 107. 1943.

COLLINS, M. K. et al. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 7, p. 2062-2073, 2009.

COX, J. E. Oestrone and equilin in the plasma of the pregnant mare. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 463-468, 1975.

COYNE, M. J. et al. Cloning and expression of ADAM-related metalloproteases in equine laminitis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 129, n. 3-4, p. 231-241, 2009.

CRUMP, A. et al. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. **Journal of reproduction and fertility. Suppl**

DENKER, H. W.; BETTERIDGE, K. J.; SIROIS, J. Shedding of the capsule and proteinase activity in the horse. **J. Reprod. Fert., Suppl**, v. 35, p. 708, 1987.

EKERFELT, C. et al. Paternal leukocytes selectively increase secretion of IL-4 in peripheral blood during normal pregnancies: demonstrated by a novel one-way MLC measuring cytokine secretion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 38, n. 5, p. 320-326, 1997.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K. M. Trophoblast-Uterine interactions during equine chorionic girdle cell maturation, migration, and transformation. **American journal of anatomy**, v. 192, n. 4, p. 366-381, 1991.

EWART, J. C. VII.—Studies on the Development of the Horse. I. The Development during the Third Week. **Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh**, v. 51, n. 2, p. 287-329, 1917.

FALLON, P. G. et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. **Immunity**, v. 17, n. 1, p. 7-17, 2002.

FAO (2017). Statistical databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FARAMARZI, B; RICH, L. J.; WU, J. Hematological and serum biochemical profile values in pregnant and non-pregnant mares. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 82, n. 4, p. 287-293, 2018.

FEDORKA, C. E. et al. Alterations in T cell-related transcripts at the fetomaternal interface throughout equine gestation. **Placenta**, v. 89, p. 78-87, 2020.

- FIGARSKA, A. et al. Serum Cytokine Reactions during Pregnancy in Healthy Mares. **Agriculture**, v. 13, n. 2, p. 331, 2023.
- FIGUEIREDO, A. S.; SCHUMACHER, A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology*, v. 148, n. 1, p. 13-21, 2016.
- FLOOD, P. F.; BETTERIDGE, K. J.; DIOCEE, M. S. Transmission electron microscopy of horse embryos 3-16 days after ovulation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 32, p. 319-327, 1982.
- GAGNON, A. et al. Obstetrical Complications Associated With Abnormal Maternal Serum Markers Analytes. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 30, n. 10, p. 918-932, 2008.
- GEISERT, R. D. et al. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 40, p. 293-305, 1990.
- GHAEBI, M. et al. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 61-73, 2017.
- GINTHER, O. J. Equine embryo mobility. A friend of theriogenologists. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 106, p. 103747, 2021.
- GINTHER, O. J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. In: **Proc Am Assoc Equine Pract.** 1998. p. 73-104.
- GLEICH, G. J. Historical overview and perspective on the role of the eosinophil in health and disease. In: **Eosinophils in health and disease.** Academic Press, 2013. p. 1-11.
- GRANT, D. M. et al. Fibrinogen in equine pregnancy as a mediator of cell adhesion, an epigenetic and functional investigation. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 1, p. 170-184, 2020.
- GRIFFIN, P. G.; CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Animal reproduction science**, v. 31, n. 3-4, p. 311-329, 1993.
- GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 47-56, 1990.
- HARVEY, J. W. et al. Haematological findings in pregnant, postparturient and nursing mares. **Comparative Haematology International**, v. 4, p. 25-29, 1994.
- HARVEY, J. W. et al. Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. **Veterinary clinical pathology**, v. 34, n. 3, p. 248-254, 2005.
- HERRERA-LUNA, C. V.; BUDIK, S.; AURICH, C. Gene Expression of ACTH, Glucocorticoid Receptors, 11 $\beta$ HSD Enzymes, LH-, FSH-, GH Receptors and Aromatase in Equine Epididymal and Testicular Tissue. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. 6, p. 928-935, 2012.

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-750, 2008.

IWAKI, T et al. Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during embryonic development in the mouse. **The American journal of pathology**, v. 160, n. 3, p. 1021-1034, 2002.

IWAKI, T; CASTELLINO, F J. Maternal fibrinogen is necessary for embryonic development. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 535-539, 2005.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária – bioquímica clínica e hematologia**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2003.

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, 2011.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M.H. Transcriptional profiling of equine conceptus reveals new aspects of embryo-maternal communication in the horse. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 872–885, 2011.

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

KURAR, E. et al. POMC, iNOS, PGES, IL-4, IL-5 and IL-10 Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Cyclic and Pregnant Mares. **kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi**, v. 17, n. 2, 2011.

LIMA, R. A. de S. et al. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. **Brasília: MAPA**, 2016.

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

MARIELLA, J. et al. Hematologic and biochemical profiles in Standardbred mares during peripartum. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 526-534, 2014.

MAKHSEED, M. et al. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Human Reproduction*, v. 16, n. 10, p. 2219-2226, 2001.

MCKINNON, A. O. et al. Bisection of equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 129-133, 1989.

MILINKOVIĆ-TUR, S. et al. Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. **Veterinarski arhiv**, v. 75, n. 3, p. 195-202, 2005.

MOR, G. et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, p. 80, 2011.

- MORRIS, D. D. Diseases of the hemolymphatic system. **Equine Internal Medicine. Philadelphia: Saunders**, p. 564-566, 1998.
- MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine veterinary journal**, v. 34, n. 1, p. 51-60, 2002.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in immunology**, v. 46, p. 111-147, 1989.
- NORONHA, L. E.; ANTCZAK, D. F. Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. **American journal of reproductive immunology**, v. 64, n. 4, p. 231-244, 2010.
- O'NEILL, C. Examination of the causes of early pregnancy-associated thrombocytopenia in mice. **Reproduction**, v. 73, n. 2, p. 567-577, 1985.
- ORIOLE, J. G. et al. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. **Molecular reproduction and development**, v. 34, n. 3, p. 255-265, 1993.
- OROZCO, C. A. G. et al. Hematological values and total protein of Brasileiro de Hipismo and Breton mares during pregnancy. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1695-1700, 2007.
- OZEN, M.; NOVAK, C.; BURD, I. Placenta immune infiltrates and perinatal outcomes. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 5, p. e12850, 2018.
- PASHEN, R. L.; ALLEN, W. R. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 27, p. 499, 1979.
- RAGHUPATHY, R. et al. Cytokine patterns in maternal blood after premature rupture of membranes. **Obstetrics & Gynecology**, v. 98, n. 1, p. 122-126, 2001.
- RAHEEM, K. A. An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2017.
- RAVIN, K. A.; LOY, M. The eosinophil in infection. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 50, p. 214-227, 2016.
- REBAR, A. H. et al. **Guia de hematologia para cães e gatos**. Roca, 2003.
- RIIHIMÄKI, M et al. Epithelial expression of mRNA and protein for IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in endobronchial biopsies in horses with recurrent airway obstruction. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2008.

SAINI, V. et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **Clinica chimica acta**, v. 412, n. 9-10, p. 702-708, 2011.

SAITO, S et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American journal of reproductive immunology**, v. 63, n. 6, p. 601-610, 2010.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, D. H. Ultrastructural development of the equine placenta. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 575-578, 1975.

SÁNCHEZ-MATAMOROS, A. et al. Development and evaluation of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for evaluation of cytokine gene expression in horse. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 50-53, 2013.

SATUÉ, K.; MONTESINOS, P. Plasma biochemistry in pregnant Spanish purebred broodmares. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, p. 113-117, 2013.

SHAMRI, R.; XENAKIS, J. J.; SPENCER, L. A. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. **Cell and tissue research**, v. 343, n. 1, p. 57-83, 2011.

SHORT, R. V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. **Foetal autonomy**, v. 2, p. 31, 1969.

SLUKVIN, I. I.; BREBURDA, E. E.; GOLOS, T. G. Dynamic changes in primate endometrial leukocyte populations: differential distribution of macrophages and natural killer cells at the rhesus monkey implantation site and in early pregnancy. **Placenta**, v. 25, n. 4, p. 297-307, 2004.

TACHIBANA, Y. et al. Expression of endometrial immune-related genes possibly functioning during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 1, p. 85-91, 2013.

VAN NIEKERK, C.H.; ALLEN, W.R. Early embryonic development in the horse *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 23 495–498, 1975.

WEBER, J. A. et al. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 4, p. 544-546, 1991.

WHYTE, A.; BINNS, R. M. Adhesion molecule expression and infiltrating maternal leucocyte phenotypes during blastocyst implantation in the pig. **Cell biology international**, v. 18, n. 7, p. 759-766, 1994.



**APÊNDICE A – Resumo apresentado no XXV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.**

**Hematological and biochemical analysis during early pregnancy in mares**

*Análise hematológica e bioquímica durante a prenhez inicial da égua*

**Leonardo Glaeser Paul<sup>1</sup>, Isabele Colla Lazzari Royes<sup>1,\*</sup>, Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2</sup>,  
Juliana Pereira Matheus<sup>3</sup>, Vanessa Canal<sup>1</sup>, Gustavo Rupp Larentis<sup>1</sup>, Gustavo  
Henrique Zimmer Winter<sup>1</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>2</sup>, Henrique Boll de Araujo  
Bastos<sup>1</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil;

<sup>2</sup>HISTOREP – Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil;

<sup>3</sup>Laboratório Zelle de Patologia Clínica, Porto Alegre-RS, Brasil.

\*E-mail: isabelelazzari97@gmail.com

There is a complex mechanism of embryo-maternal interaction, which allows an exact sequence of events for maternal recognition of pregnancy, maintenance of the primary corpus luteum, and appropriate embryo development. Systemic changes during early pregnancy in the mare have been sparingly studied. However, they may reveal important aspects of the complex physiology of the embryo, which thrives as a semi-allograft in the mother's uterus during pregnancy. This study aimed to demonstrate hematological and biochemical variations during the initial period of equine pregnancy. Blood samples were collected from 10 cyclic mares on ovulation induction (D-2) with human chorionic gonadotrophin during the breeding season and post-ovulation on days 15 (D15), 25 (D25), and 45 (D45). The mares were inseminated, those pregnant (n=8) were kept in the experimental groups, and the no pregnant were excluded from the study. The samples collected through jugular venipuncture were sent to a laboratory for hematological and biochemical analysis. Hemoglobin dosage, erythrocyte count, and total leukocyte count have been performed automatically using the Sysmex pocH-100i™ automated hematology analyzer. The specific or differential count was performed by microscopic examination of the blood. The serum samples were analyzed for the biochemical tests using the colorimetric-kinetic/enzymatic measurement method, according to the specific technical method for each analyte, using LABTEST® commercial kits and an automatic biochemical analyzer Labmax 240, LABTEST®. Days were considered independent, and hematological and biochemical analyses were dependent variables. Data were analyzed using a t-test. Blood count eosinophils increase concentration from D-2 to D25 ( $P = 0.050$ ) and decrease from D25 to D45 ( $P = 0.033$ ). The segmented leukocytes showed a decrease ( $P = 0.005$ ) between the D-2 and D15. Aspartate Transferase (AST) showed an increasing trend ( $P = 0.085$ ) between D-2 and D15 and a higher ( $P = 0.009$ ) concentration on D25 compared to D-2. Eosinophils and segmented leukocytes may play an essential role in early pregnancy, possibly reflecting the cellular immune response to the fetal semi-allograft. Even though AST does not have tissue specificity, it can be found mainly in the liver and skeletal muscles, which corroborates with the endocrine involvement generated by pregnancy. We conclude that systemic alterations occur in the mares during the initial pregnancy period. These alterations may have an essential role in embryo-maternal communication and fetal development.

**Palavras-chave:** reprodução equina, prenhez, embrião

**Keywords:** equine reproduction, pregnancy, embryo

**APÊNDICE B – Análise de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas**

	Eosinófilos	IL4	FA	Biirubiina Dir	Leuc. Tot
Eosinófilos	1,0000	,2397	,5167	-,3748	,3833
	p= ---	p=,271	p=,012	p=,078	p=,071
IL4	,2397	1,0000	,4022	-,0855	,5094
	p=,271	p= ---	p=,057	p=,698	p=,013
FA	,5167	,4022	1,0000	-,3467	,7703
	p=,012	p=,057	p= ---	p=,105	p=,000
Biirubiina Dir	-,3748	-,0855	-,3467	1,0000	-,2571
	p=,078	p=,698	p=,105	p= ---	p=,236
Leuc. Tot	,3833	,5094	,7703	-,2571	1,0000
	p=,071	p=,013	p=,000	p=,236	p= ---
Leuc. Seg	,2991	,0737	,5071	-,2657	,7354
	p=,166	p=,738	p=,014	p=,220	p=,000
AST	,2987	,1532	,6739	-,2600	,5133
	p=,166	p=,485	p=,000	p=,231	p=,012
Hemácias	-,3923	,0555	-,0737	-,1027	,1289
	p=,064	p=,801	p=,738	p=,641	p=,558
Hemoglobina	-,3120	-,0161	-,0062	-,0616	,1615
	p=,147	p=,942	p=,978	p=,780	p=,462
Hematócrito	-,3144	-,1325	,0616	-,2071	,1378
	p=,144	p=,547	p=,780	p=,343	p=,531
V.C.M.	,1702	-,4210	,3219	-,3187	,0376
	p=,438	p=,045	p=,134	p=,138	p=,865
C.H.C.M	-,2286	,2272	,0588	,2807	,0361
	p=,294	p=,297	p=,790	p=,195	p=,870
PPT	,4771	,4586	,8175	-,6149	,7499
	p=,021	p=,028	p=,000	p=,002	p=,000
Linfócitos	-,0294	,5951	,5606	-,0204	,7876
	p=,894	p=,003	p=,005	p=,926	p=,000
Monócitos	,6141	,5426	,4041	-,3154	,4986
	p=,002	p=,007	p=,056	p=,143	p=,015
Basófilos	,2727	-,0495	,0904	,2771	-,0240
	p=,208	p=,823	p=,682	p=,201	p=,913
Plaq. Tot	-,2811	-,3648	-,0090	-,1071	-,1149
	p=,194	p=,087	p=,968	p=,627	p=,601
Bilir. Tot	-,5577	-,2867	-,8111	,4987	-,7316
	p=,006	p=,185	p=,000	p=,015	p=,000
Albumina	-,4196	-,2401	-,4491	-,0717	-,4317
	p=,046	p=,270	p=,032	p=,745	p=,040
Cálcio Tot	-,0733	,1215	-,1678	-,1271	-,1015
	p=,739	p=,581	p=,444	p=,563	p=,645
Creatinina	-,5804	-,2994	-,7644	,6222	-,6397
	p=,004	p=,165	p=,000	p=,002	p=,001
Fibrinogênio	,1167	,0117	,4148	-,2337	,1342
	p=,596	p=,958	p=,049	p=,283	p=,541
Fósforo	,1855	,3136	,5798	-,1306	,4652
	p=,397	p=,145	p=,004	p=,552	p=,025
Prot. Tot	,4433	,4925	,8248	-,6256	,7526
	p=,034	p=,017	p=,000	p=,001	p=,000
Ureia	-,0108	-,0859	,4211	-,3004	,3662
	p=,961	p=,697	p=,045	p=,164	p=,086
TNF	,0308	,4785	,3459	-,1342	,5149
	p=,889	p=,021	p=,106	p=,542	p=,012
Recp. LH	,1346	,5207	,3342	-,1571	,2807
	p=,540	p=,011	p=,119	p=,474	p=,195

	Leuc. Seg	AST	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito
Eosinófilos	,2991	,2987	-,3923	-,3120	-,3144
	p=,166	p=,166	p=,064	p=,147	p=,144
IL4	,0737	,1532	,0555	-,0161	-,1325
	p=,738	p=,485	p=,801	p=,942	p=,547
FA	,5071	,6739	-,0737	-,0062	,0616
	p=,014	p=,000	p=,738	p=,978	p=,780
Biirrubina Dir	-,2657	-,2600	-,1027	-,0616	-,2071
	p=,220	p=,231	p=,641	p=,780	p=,343
Leuc. Tot	,7354	,5133	,1289	,1615	,1378
	p=,000	p=,012	p=,558	p=,462	p=,531
Leuc. Seg	1,0000	,2758	,0545	,1661	,1770
	p= ---	p=,203	p=,805	p=,449	p=,419
AST	,2758	1,0000	,1340	,2216	,2831
	p=,203	p= ---	p=,542	p=,309	p=,191
Hemácias	,0545	,1340	1,0000	,7953	,8572
	p=,805	p=,542	p= ---	p=,000	p=,000
Hemoglobina	,1661	,2216	,7953	1,0000	,8363
	p=,449	p=,309	p=,000	p= ---	p=,000
Hematócrito	,1770	,2831	,8572	,8363	1,0000
	p=,419	p=,191	p=,000	p=,000	p= ---
V.C.M.	,2698	,3300	-,2382	,0767	,2491
	p=,213	p=,124	p=,274	p=,728	p=,252
C.H.C.M	-,0790	-,0734	,1871	,3690	-,0199
	p=,720	p=,739	p=,393	p=,083	p=,928
PPT	,5805	,6761	,1344	,1925	,2216
	p=,004	p=,000	p=,541	p=,379	p=,310
Linfócitos	,2376	,4350	,2786	,2340	,1716
	p=,275	p=,038	p=,198	p=,283	p=,434
Monócitos	,3486	,2674	-,1306	-,1817	-,0960
	p=,103	p=,217	p=,553	p=,407	p=,663
Basófilos	-,1136	-,0052	-,3387	-,3496	-,3977
	p=,606	p=,981	p=,114	p=,102	p=,060
Plaq. Tot	-,0874	,0639	,4265	,6182	,5649
	p=,692	p=,772	p=,042	p=,002	p=,005
Bilir. Tot	-,6553	-,5720	,2823	,2159	,1358
	p=,001	p=,004	p=,192	p=,322	p=,537
Albumina	-,1958	-,1930	,3260	,3683	,4131
	p=,371	p=,378	p=,129	p=,084	p=,050
Cálcio Tot	-,1932	-,1124	,4790	,2508	,3884
	p=,377	p=,610	p=,021	p=,248	p=,067
Creatinina	-,5478	-,4518	,2686	,1563	,1327
	p=,007	p=,030	p=,215	p=,476	p=,546
Fibrinogênio	,0987	,3692	,3207	,3161	,4085
	p=,654	p=,083	p=,136	p=,142	p=,053
Fósforo	,0347	,5796	-,0463	,1270	-,0045
	p=,875	p=,004	p=,834	p=,564	p=,984
Prot. Tot	,5301	,7144	,1371	,1283	,1789
	p=,009	p=,000	p=,533	p=,560	p=,414
Ureia	,3835	,4414	,0005	,1975	,1843
	p=,071	p=,035	p=,998	p=,366	p=,400
TNF	,1706	,2020	,2540	,2351	,0479
	p=,436	p=,355	p=,242	p=,280	p=,828
Recp. LH	,0627	,1339	-,1283	-,0928	-,2878
	p=,776	p=,542	p=,560	p=,674	p=,183

	V.C.M.	C.H.C.M	PPT	Linfócitos	Monócitos	Basófilos
Eosinófilos	,1702	-,2286	,4771	-,0294	,6141	,2727
	p=,438	p=,294	p=,021	p=,894	p=,002	p=,208
IL4	-,4210	,2272	,4586	,5951	,5426	-,0495
	p=,045	p=,297	p=,028	p=,003	p=,007	p=,823
FA	,3219	,0588	,8175	,5606	,4041	,0904
	p=,134	p=,790	p=,000	p=,005	p=,056	p=,682
Biirrubina Dir	-,3187	,2807	-,6149	-,0204	-,3154	,2771
	p=,138	p=,195	p=,002	p=,926	p=,143	p=,201
Leuc. Tot	,0376	,0361	,7499	,7876	,4986	-,0240
	p=,865	p=,870	p=,000	p=,000	p=,015	p=,913
Leuc. Seg	,2698	-,0790	,5805	,2376	,3486	-,1136
	p=,213	p=,720	p=,004	p=,275	p=,103	p=,606
AST	,3300	-,0734	,6761	,4350	,2674	-,0052
	p=,124	p=,739	p=,000	p=,038	p=,217	p=,981
Hemácias	-,2382	,1871	,1344	,2786	-,1306	-,3387
	p=,274	p=,393	p=,541	p=,198	p=,553	p=,114
Hemoglobina	,0767	,3690	,1925	,2340	-,1817	-,3496
	p=,728	p=,083	p=,379	p=,283	p=,407	p=,102
Hematócrito	,2491	-,0199	,2216	,1716	-,0960	-,3977
	p=,252	p=,928	p=,310	p=,434	p=,663	p=,060
V.C.M.	1,0000	-,3454	,2427	-,1940	,0032	-,2078
	p= ---	p=,106	p=,264	p=,375	p=,988	p=,341
C.H.C.M	-,3454	1,0000	,0351	,2245	-,2898	,1046
	p=,106	p= ---	p=,874	p=,303	p=,180	p=,635
PPT	,2427	,0351	1,0000	,4852	,5537	-,0286
	p=,264	p=,874	p= ---	p=,019	p=,006	p=,897
Linfócitos	-,1940	,2245	,4852	1,0000	,2264	-,0552
	p=,375	p=,303	p=,019	p= ---	p=,299	p=,802
Monócitos	,0032	-,2898	,5537	,2264	1,0000	,0581
	p=,988	p=,180	p=,006	p=,299	p= ---	p=,792
Basófilos	-,2078	,1046	-,0286	-,0552	,0581	1,0000
	p=,341	p=,635	p=,897	p=,802	p=,792	p= ---
Plaq. Tot	,3006	,3178	,0432	,0115	-,4366	-,0781
	p=,163	p=,139	p=,845	p=,959	p=,037	p=,723
Bilir. Tot	-,3722	,2272	-,7804	-,3855	-,4269	-,0475
	p=,080	p=,297	p=,000	p=,069	p=,042	p=,830
Albumina	,0960	-,1391	-,3145	-,3570	-,3178	-,6314
	p=,663	p=,527	p=,144	p=,095	p=,139	p=,001
Cálcio Tot	-,2471	-,2487	-,0422	-,0127	,0688	,0193
	p=,256	p=,252	p=,848	p=,954	p=,755	p=,930
Creatinina	-,3239	,0948	-,8008	-,3125	-,4692	-,1866
	p=,132	p=,667	p=,000	p=,147	p=,024	p=,394
Fibrinogênio	,1454	,1418	,4543	,0443	,1013	,1569
	p=,508	p=,519	p=,029	p=,841	p=,646	p=,475
Fósforo	,0951	,2664	,5338	,5972	,2523	,3624
	p=,666	p=,219	p=,009	p=,003	p=,245	p=,089
Prot. Tot	,2004	,0104	,9710	,5415	,5080	-,0699
	p=,359	p=,963	p=,000	p=,008	p=,013	p=,751
Ureia	,2919	,0368	,4368	,2457	,0100	,1652
	p=,176	p=,867	p=,037	p=,259	p=,964	p=,451
TNF	-,3454	,4671	,4128	,6270	,2225	,0934
	p=,106	p=,025	p=,050	p=,001	p=,307	p=,672
Recp. LH	-,1804	,3142	,4659	,3345	,2015	,1561
	p=,410	p=,144	p=,025	p=,119	p=,356	p=,477

	Plaq. Tot	Bilir. Tot	Albumina	Cálcio Tot	Creatinina
Eosinófilos	-,2811	-,5577	-,4196	-,0733	-,5804
	p=,194	p=,006	p=,046	p=,739	p=,004
IL4	-,3648	-,2867	-,2401	,1215	-,2994
	p=,087	p=,185	p=,270	p=,581	p=,165
FA	-,0090	-,8111	-,4491	-,1678	-,7644
	p=,968	p=,000	p=,032	p=,444	p=,000
Biirrubina Dir	-,1071	,4987	-,0717	-,1271	,6222
	p=,627	p=,015	p=,745	p=,563	p=,002
Leuc. Tot	-,1149	-,7316	-,4317	-,1015	-,6397
	p=,601	p=,000	p=,040	p=,645	p=,001
Leuc. Seg	-,0874	-,6553	-,1958	-,1932	-,5478
	p=,692	p=,001	p=,371	p=,377	p=,007
AST	,0639	-,5720	-,1930	-,1124	-,4518
	p=,772	p=,004	p=,378	p=,610	p=,030
Hemácias	,4265	,2823	,3260	,4790	,2686
	p=,042	p=,192	p=,129	p=,021	p=,215
Hemoglobina	,6182	,2159	,3683	,2508	,1563
	p=,002	p=,322	p=,084	p=,248	p=,476
Hematócrito	,5649	,1358	,4131	,3884	,1327
	p=,005	p=,537	p=,050	p=,067	p=,546
V.C.M.	,3006	-,3722	,0960	-,2471	-,3239
	p=,163	p=,080	p=,663	p=,256	p=,132
C.H.C.M	,3178	,2272	-,1391	-,2487	,0948
	p=,139	p=,297	p=,527	p=,252	p=,667
PPT	,0432	-,7804	-,3145	-,0422	-,8008
	p=,845	p=,000	p=,144	p=,848	p=,000
Linfócitos	,0115	-,3855	-,3570	-,0127	-,3125
	p=,959	p=,069	p=,095	p=,954	p=,147
Monócitos	-,4366	-,4269	-,3178	,0688	-,4692
	p=,037	p=,042	p=,139	p=,755	p=,024
Basófilos	-,0781	-,0475	-,6314	,0193	-,1866
	p=,723	p=,830	p=,001	p=,930	p=,394
Plaq. Tot	1,0000	,2185	,2214	,3381	,0028
	p= ---	p=,317	p=,310	p=,115	p=,990
Bilir. Tot	,2185	1,0000	,3653	,1974	,8727
	p=,317	p= ---	p=,087	p=,367	p=,000
Albumina	,2214	,3653	1,0000	,2975	,3742
	p=,310	p=,087	p= ---	p=,168	p=,079
Cálcio Tot	,3381	,1974	,2975	1,0000	,0243
	p=,115	p=,367	p=,168	p= ---	p=,912
Creatinina	,0028	,8727	,3742	,0243	1,0000
	p=,990	p=,000	p=,079	p=,912	p= ---
Fibrinogênio	,1507	-,1362	-,1625	-,0735	-,1679
	p=,493	p=,535	p=,459	p=,739	p=,444
Fósforo	,0834	-,3918	-,5813	-,2101	-,4891
	p=,705	p=,064	p=,004	p=,336	p=,018
Prot. Tot	-,0363	-,8016	-,3370	-,0601	-,7642
	p=,869	p=,000	p=,116	p=,785	p=,000
Ureia	,2179	-,3130	-,2068	-,1993	-,4529
	p=,318	p=,146	p=,344	p=,362	p=,030
TNF	,1592	-,2720	-,1695	,1325	-,4288
	p=,468	p=,209	p=,440	p=,547	p=,041
Recp. LH	,0096	-,3715	-,2327	,0703	-,5011
	p=,965	p=,081	p=,285	p=,750	p=,015

	Fibrinogênio	Fósforo	Prot. Tot	Ureia	TNF	Recp. LH
Eosinófilos	,1167	,1855	,4433	-,0108	,0308	,1346
	p=,596	p=,397	p=,034	p=,961	p=,889	p=,540
IL4	,0117	,3136	,4925	-,0859	,4785	,5207
	p=,958	p=,145	p=,017	p=,697	p=,021	p=,011
FA	,4148	,5798	,8248	,4211	,3459	,3342
	p=,049	p=,004	p=,000	p=,045	p=,106	p=,119
Biirrubina Dir	-,2337	-,1306	-,6256	-,3004	-,1342	-,1571
	p=,283	p=,552	p=,001	p=,164	p=,542	p=,474
Leuc. Tot	,1342	,4652	,7526	,3662	,5149	,2807
	p=,541	p=,025	p=,000	p=,086	p=,012	p=,195
Leuc. Seg	,0987	,0347	,5301	,3835	,1706	,0627
	p=,654	p=,875	p=,009	p=,071	p=,436	p=,776
AST	,3692	,5796	,7144	,4414	,2020	,1339
	p=,083	p=,004	p=,000	p=,035	p=,355	p=,542
Hemácias	,3207	-,0463	,1371	,0005	,2540	-,1283
	p=,136	p=,834	p=,533	p=,998	p=,242	p=,560
Hemoglobina	,3161	,1270	,1283	,1975	,2351	-,0928
	p=,142	p=,564	p=,560	p=,366	p=,280	p=,674
Hematócrito	,4085	-,0045	,1789	,1843	,0479	-,2878
	p=,053	p=,984	p=,414	p=,400	p=,828	p=,183
V.C.M.	,1454	,0951	,2004	,2919	-,3454	-,1804
	p=,508	p=,666	p=,359	p=,176	p=,106	p=,410
C.H.C.M	,1418	,2664	,0104	,0368	,4671	,3142
	p=,519	p=,219	p=,963	p=,867	p=,025	p=,144
PPT	,4543	,5338	,9710	,4368	,4128	,4659
	p=,029	p=,009	p=,000	p=,037	p=,050	p=,025
Linfócitos	,0443	,5972	,5415	,2457	,6270	,3345
	p=,841	p=,003	p=,008	p=,259	p=,001	p=,119
Monócitos	,1013	,2523	,5080	,0100	,2225	,2015
	p=,646	p=,245	p=,013	p=,964	p=,307	p=,356
Basófilos	,1569	,3624	-,0699	,1652	,0934	,1561
	p=,475	p=,089	p=,751	p=,451	p=,672	p=,477
Plaq. Tot	,1507	,0834	-,0363	,2179	,1592	,0096
	p=,493	p=,705	p=,869	p=,318	p=,468	p=,965
Bilir. Tot	-,1362	-,3918	-,8016	-,3130	-,2720	-,3715
	p=,535	p=,064	p=,000	p=,146	p=,209	p=,081
Albumina	-,1625	-,5813	-,3370	-,2068	-,1695	-,2327
	p=,459	p=,004	p=,116	p=,344	p=,440	p=,285
Cálcio Tot	-,0735	-,2101	-,0601	-,1993	,1325	,0703
	p=,739	p=,336	p=,785	p=,362	p=,547	p=,750
Creatinina	-,1679	-,4891	-,7642	-,4529	-,4288	-,5011
	p=,444	p=,018	p=,000	p=,030	p=,041	p=,015
Fibrinogênio	1,0000	,4100	,3860	,3389	-,0626	-,1747
	p= ---	p=,052	p=,069	p=,114	p=,776	p=,425
Fósforo	,4100	1,0000	,5180	,4784	,4540	,3582
	p=,052	p= ---	p=,011	p=,021	p=,030	p=,093
Prot. Tot	,3860	,5180	1,0000	,4041	,4043	,4630
	p=,069	p=,011	p= ---	p=,056	p=,056	p=,026
Ureia	,3389	,4784	,4041	1,0000	,1389	,0490
	p=,114	p=,021	p=,056	p= ---	p=,527	p=,824
TNF	-,0626	,4540	,4043	,1389	1,0000	,5770
	p=,776	p=,030	p=,056	p=,527	p= ---	p=,004
Recp. LH	-,1747	,3582	,4630	,0490	,5770	1,0000
	p=,425	p=,093	p=,026	p=,824	p=,004	p= ---