

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal:

Equinos

JORGE EMILIO CABALLEROS HAEUSSLER

**Alterações na arquitetura e na
estrutura do endométrio na Égua no 5^o
Dia Pós-Ovulação**

PORTO ALEGRE

2016

JORGE EMILIO CABALLEROS HAEUSSLER

**Alterações na arquitetura e na
estrutura do endométrio na Égua no 5^o
Dia Pós-Ovulação**

Trabalho apresentado ao Programa de Pósgraduação em Medicina Animal: Equinos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Caballeros Haeussler, Jorge Emilio
Alterações na arquitetura e na estrutura do
endométrio na égua no 5o dia pós-ovulação / Jorge
Emilio Caballeros Haeussler. -- 2016.
52 f.

Orientador: 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, 2016.

1. Endométrio Equino. 2. Microscopia eletrônica de
Varredura. 3. Histomorfometria. I. Costa Mattos,
Rodrigo, orient. II. Título.

Trabalho apresentado ao Programa de Pósgraduação em Medicina Animal:
Equinos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do
grau de Mestre em Medicina Animal : Equinos

JORGE EMILIO CABALLEROS HAEUSSLER

Trabalho apresentado em

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos - UFRGS

Orientador

Profa. Dra. Maria Ines Jobim - UFRGS

Membro da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini - UFRGS

Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky - ULBRA

Membro da Comissão

Dedicatória A los educadores de mi vida temprana

AGRADECIMENTOS

No primeiro lugar agradeço a Deus por ter me permitido chegar alcançar um passo mais no sonho de avançar na minha formação profissional. Tudo aquilo que aconteceu na minha vida me levou até aqui, passo a passo as coisas aconteceram de um jeito que as vezes não achamos seja como nós queremos. Mas o que sabemos nós do plano perfeito?

A os meus Pais que me formaram a pessoa que hoje sou com altos e baixos, sucesso e decepções, vitórias e derrotas, mas nunca perdendo a fé, em Deus e em mim. Tudo o que vocês se esforçaram está valendo.

A Mamita e Papito lá encima, sem vocês eu não teria resultado assim. Os ensinamentos, as lembranças e o carinho são o que me faz atuar como atuo dia a dia. Além de tudo com vocês aprendí a ser um velho de espírito, coisa que não trocaria por nada no mundo.

À minha noiva Karen pela paciência nestes meses longe o um do outro, mais do que paciência, amor. Quando eu não me acho bom o suficiente ou inteligente o suficiente tu sempre acredita em mim.

Ao Professor Rodrigo pela confiança que o senhor sempre teve na gente, desde o momento de dar a nós a possibilidade de vir para o Brasil passando pelo projeto e até o dia de hoje com os projetos futuros.

À Dona Marlene pelo carinho, paciência, e muito especialmente pela melhora no português. Sentirei muitas saudades de você e dos bichos.

Ao meu amigo César com quem fomos o apoio o um do outro nestes meses, pela amizade no primeiro lugar, mas também pelos ensinamentos e pelo impulso para não ficar na decepção e seguir na frente para conseguir um sonho mais.

**“Marimba, tu arpeggio de oro
Es un poema canoro
Que se quiebra en madrigal
de Dulce melacolía
Y al tornarse en poesia
Se vuelve épico y triunfal.
Por eso la raza entera
Tanto te quiere y te admira
Y el que está lejos suspira
Por tus notas de turpial
Porque eres Marimba lira
La pauta donde se inspira
La leyenda del Quetzal”**

Rudy Solares Gálvez

RESUMO

Alterações na arquitetura e na estrutura do endométrio na Égua no 5º Dia Pós-Ovulação

Autor: Jorge Emilio Caballeros Haeussler

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Rápidas adaptações endometriais ocorrem com a chegada do embrião no útero para criar um ambiente uterino receptivo, que é essencial para o desenvolvimento do concepto. As descrições dos eventos endometriais que ocorrem antes da chegada do embrião ao útero, são escassas. O objetivo deste experimento foi demonstrar mudanças na arquitetura e na estrutura do endométrio que ocorrem no dia 5 pós-ovulação em éguas cíclicas e inseminadas. Amostras de biopsia endometrial foram recolhidas em torno do dia 5 pós-ovulação em um grupo de 10 éguas reprodutivamente saudáveis, uma de cada corno, durante dois ciclos. No primeiro como 'Cíclicas' (n = 10) e no seguinte estas mesmas foram inseminadas para formar o grupo 'Inseminadas' (n = 10). As éguas inseminadas foram subdivididas em dois subgrupos: aquelas em que as amostras foram recolhidas antes do dia 5.5 e aquelas em que as amostras foram depois do dia 5.5. As biopsias endometriais foram analisadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A densidade, o diâmetro, o epitélio, o lúmen e a secreção glandular, foram submetidos à análise histomorfométrica. As células brancas foram avaliadas em uma contagem diferencial. As células ciliadas, poligonais com microvilosidades, e a presença de células planas ou ingurgitadas no epitélio, na microscopia eletrônica de varredura, foram analisados por uma contagem individual de cada um dos tipos celulares.

Houve um aumento no diâmetro glandular, uma diminuição significativa nas células ciliadas e um aumento significativo na população de linfócitos nas éguas inseminadas, quando comparadas com as égua cíclicas. Na análise dos subgrupos de éguas inseminadas, não houve diferenças nas variáveis. Estes resultados levam a concluir que mudanças significativas ocorrem no endométrio no dia 5 pós ovulação, na égua inseminada.

Palavras-chave: Célula ciliada, diâmetro glandular, linfócito, embrião.

ABSTRACT

Mare Endometrial Architectural and Structural changes at Day 5 post-ovulation

Autor: Jorge Emilio Caballeros Haeussler

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Rapid endometrial adaptations occur as the embryo enters the uterus to create a receptive uterine environment, which is essential for the conceptus' development. Descriptions of endometrial events before the embryo reaches the uterus, are scant. The aim of this experiment was to demonstrate architectural and structural changes in the endometrium on day 5 after ovulation in cyclic and inseminated mares. Endometrial biopsy samples were taken during day 5 post-ovulation from a group of 10 reproductively healthy mares, one from each uterine horn, during two cycles. The first one they were considered as 'cyclic' (n = 10), and in the following one, the same mares were inseminated to constitute the 'inseminated' group (n = 10). Inseminated mares were subdivided into two subgroups: those sampled before day 5.5 and those sampled after day 5.5. Biopsy samples were analyzed through optic microscopy and scanning electron microscopy. Glandular density, diameter, epithelial height, lumen, and secretion were analyzed through histomorphometry. White blood cells were evaluated through a differential cell count. Ciliated cells, micro-ciliated polygonal cells, and flat or protruded cells over the epithelium, on scanning electron microscopy, were analyzed through an individual cell type count. Inseminated mares presented an increase in glandular diameter, significant decrease in ciliated cell

population, and a significant increase in lymphocyte population, compared to cyclic mares. No differences in any of the variables were detected between subgroups from inseminated mares. The results here presented lead to the conclusion that significant endometrial changes occur on day 5 post-ovulation in inseminated mares.

Key-words: Ciliated Cell, glandular diameter, lymphocyte, embryo.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diagrama esquemático das camadas uterinas (Kenney, 1978).	22
FIGURA 2. Electromicrographs showing cellular types composing epithelial surface of the endometrium: ciliated and micro-ciliated polygonal cells (a), protruded cells (b), folded epithelium with minor sulci showing both types of cells, ciliated and micro ciliated polygonal cells (c).....	31
FIGURA 3. Photomicrographs of mare endometrium from 'Cyclic' (a) and 'Inseminated' (b) groups, showing glandular diameter and glandular luminal diameter (HE – 400x, bar = 50 µm).....	32
FIGURA 4. Boxplots for Glandular diameter from 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation (B). Different letters (a, b) represent significant difference (P = 0.008).....	32
FIGURA 5. Electromicrographs (1000 x) showing the difference in the amount of ciliated cells between 'Cyclic' (a) and 'Inseminated' mares (b); in both, there is a predominance of micro-ciliated polygonal cells varying between flat and protruded.....	33
FIGURA 6. Boxplots for Ciliated cells observed on Scanning electron microscopy for 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation (B). Different letters (a, b) represent significant differences. (P = 0.006).....	33
FIGUARA 7. Photomicrographs of the endometrium from 'Cyclic' (a and b) and 'Inseminated' (c and d) mares, from the <i>stratum compactum</i> (a and c) and the <i>stratum spongiosum</i> (b and d); showing the amount of lymphocytes from both strata in 'inseminated' compared to 'cyclic' mares. SC = <i>stratum compactum</i> ; SS = <i>stratum spongiosum</i> (HE – 400x).....	34
FIGURA 8. Boxplots for Lymphocytes at the <i>stratum compactum</i> from 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation (B). Different letters (a, b) represent statistical difference (P < 0.001).....	35
FIGURA 9. Boxplots for Lymphocytes at the <i>stratum spongiosum</i> from 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation. Different letters (a, b) represent statistical difference (P < 0.001).....	35

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Características inusuais da prenhez equina.....	16
2.2 O útero como sistema endócrino, esteroideos e hormônios.....	17
2.3 Proliferação endometrial.....	17
2.4 Expressão de hormônios e genes no útero a partir do dia da ovulação....	18
2.5 O Útero a partir da entrada do embrião.....	20
2.6 Histologia normal do útero.....	22
2.7 Microscopia eletrônica do útero.....	24
3 ARTIGO.....	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A prenhez precoce na égua é um período fascinante que engloba inúmeros e profundos eventos e mudanças, muitos dos quais são únicos ao equino (STOUT, 2009). Entre estes, a lenta passagem do embrião equino pela tuba uterina e o transporte diferencial de oócitos e embriões no oviduto podem ser mencionados (ALLEN, 2005).

O embrião equino passa até o útero pela papila útero-tubárica depois do dia 5.5 pós-ovulação, iniciando a mobilidade por todos os segmentos uterinos (BATUT et al., 1997; SAMPER, 2009; McCUE; SQUIRES, 2015). A mobilidade do concepto pelo útero claramente tem um papel importante, alterando a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no momento do reconhecimento materno da prenhez no cavalo (MCDOWEL; SHARP, 2012). A migração do concepto lhe permite também acumular uma ampla variedade de proteínas e outros componentes das secreções endometriais na sua superfície (LEFRANC; ALLEN, 2007). Durante o período entre a entrada no útero e a fixação, o ambiente uterino torna-se física e bioquimicamente dinâmico, realizando interações materno-embrionárias vitais, evitando a luteólise e auxiliando no processo de fixação e nidação do concepto. Um endométrio funcional saudável é vital ao longo da gestação, especialmente na implantação e durante o longo período que o precede, quando as secreções exócrinas das glândulas endometriais sustentam inteiramente o concepto móvel (LEFRANC e ALLEN, 2007). O desenvolvimento embrionário precoce, a implantação e a manutenção da prenhez dependem criticamente de uma interação bem orquestrada e precisa entre o embrião e o ambiente do útero (KLEIN; TROEDSSON, 2011a).

Rápidas adaptações endometriais ocorrem com a entrada do embrião no útero. No dia 7 da gestação, a população de células ciliadas diminui quando comparada com éguas no mesmo dia do diestro, e continuam diminuindo constantemente com o avanço da gestação (KEENAN et al., 1991; MATTOS et al.,

2015). No mesmo dia da prenhez a égua apresenta células secretórias com microvilosidades ingurgitadas e é possível observar material histotrófico recobrimdo algumas áreas do epitélio. A quantidade de secreção aumenta consideravelmente com o avanço da prenhez, deixando as células ciliadas submersas e com algumas células secretórias alongadas (MATTOS et al., 2015).

Éguas prenhes apresentam transformações endometriais que resultam em valores histomorfométricos mais altos no dia 7 da prenhez, como maior diâmetro glandular, altura epitelial, lúmen, e secreção do que as éguas cíclicas. Também, foi observada uma presença elevada de linfócitos e eosinófilos comparadas com éguas controle (KEENAN et al., 1987; MARTÍNEZ et al., 2016). Provavelmente, estes linfócitos estejam relacionados com uma resposta imune ao contato inicial com o embrião, e os eosinófilos estejam modulando dita resposta (KEENAN et al., 1987; MARTÍNEZ et al., 2016).

As descrições dos eventos endometriais no dia 5 pós-ovulação, antes da chegada do embrião ao útero, são escassas. O objetivo deste experimento foi demonstrar mudanças, na arquitetura e na estrutura do endométrio que ocorrem no dia 5 pós ovulação em éguas cíclicas e inseminadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características inusuais da prenhez equina

O transporte diferenciado dos oócitos e dos embriões foi descrito por Van Niekerk e Gerneke (1966), sendo que os oócitos não fecundados só se direcionam até a união ampulo-istmica e ficam nas pregas da mucosa do oviduto e lentamente degeneram. O embrião equino passa até o útero pela papila útero-tubárica depois do dia 5.5 pós-ovulação, iniciando a mobilidade por todos os segmentos uterinos, fato que é essencial para o reconhecimento materno da prehez (BATUT et al., 1997; SAMPER, 2009; McCUE; SQUIRES, 2015). O próprio embrião sintetiza grandes quantidades de prostaglandina E2 (PGE2) no dia 5 pós-ovulação, para estimular o relaxamento e a contração do oviduto e passar para o útero (em torno de 24 horas depois) (WEBER et al., 1991; 1992; 1995). Portanto, a partir do 6º dia pós-ovulação, a composição e a qualidade do meio ambiente uterino são críticos para o contínuo suporte e desenvolvimento do concepto (KENNEY, 1978; GINTHER, 1992; BALL, 1993; CROSSET; ALLEN; STEWART, 1996).

Um endométrio funcional e saudável é vital ao longo da gestação, especialmente na implantação e durante o longo período que a precede, quando as secreções exócrinas das glândulas endometriais sustentam inteiramente o concepto móvel (LEFRANC e ALLEN, 2007).

O desenvolvimento embrionário precoce, a implantação e a manutenção da prenhez dependem criticamente de uma interação bem orquestrada e precisa entre o embrião e o ambiente do útero (KLEIN; TROEDSSON, 2011a). O embrião jovem indica sua presença, interrompe o ciclo estral e mantém a gestação, num processo conhecido como "Reconhecimento materno da prenhez" (RMP) (SHORT, 1969). A diferença dos equinos, em relação aos ruminantes e os suínos, é que estes são uma das poucas espécies domésticas na qual o sinal do RMP derivado do embrião ainda não foi identificado (KLOHONATZ et al., 2013).

Várias características da prenhez na égua são incomuns e diferem marcadamente dos eventos equivalentes bem estudados em outras espécies domésticas (ALLEN, 2005). Algumas destas interações materno-embrionárias precoces são preponderantes no êxito da gestação (MERKL, 2011).

2.2 O útero como sistema endócrino, esteróides e hormônios

O útero é parte do sistema endócrino, sendo o órgão alvo dos esteróides e produtor de hormônios (BLANCHARD et al., 2003). Os hormônios controlam a atividade secretória uterina quantitativa e qualitativamente. A sincronia entre os hormônios maternos e o desenvolvimento embrionário é uma condição para o estabelecimento da prenhez. O endométrio equino é um tecido complexo composto de vários tipos celulares: epitélio luminal e glandular, estroma e vasos, respondendo a diferentes estímulos hormonais, uma vez que o endométrio varia de uma forma cíclica em sua aparência histológica, de acordo com os níveis de esteróides ovarianos (KENNEY, 1978; KENNEY; DOIG, 1986; SCHLAFER, 2007). Tanto o estradiol (E_2) como a progesterona (P_4) mediam mudanças nos tecidos reprodutivos da égua durante o ciclo estral e a prenhez precoce (GINTHER, 1992).

2.3 Proliferação endometrial

A proliferação endometrial equina deve ser dividida em duas fases: a proliferação do estroma durante o estro e a proliferação epitelial durante o diestro (AUPPERLE et al., 2000). Exames histológicos evidenciam o epitélio luminal alcançando o pico da sua altura (20 a 30 μm , podendo chegar a 50 μm) no início do estro. Em algumas éguas o epitélio luminal parece mudar para colunar baixo (15 μm)

no final do estro. Vacúolos citoplasmáticos são comuns nas células do epitélio luminal. É comum também nessa fase, o acúmulo ou marginalização de neutrófilos polimorfonucleares ao redor de vênulas no lúmen uterino ou em capilares (KENNEY, 1978). No diestro, durante os sete primeiros dias após o estro, o epitélio luminal pode ser colunar alto (20 μm) ou baixo (15 μm) e ocasionalmente cúbico (10 μm). Gerstenberg et al. (1999) sugerem que o motivo do lento transporte do embrião no oviduto dos equinos está vinculado a este padrão de proliferação e propõem que o embrião chega ao útero no 6º dia para permitir o crescimento do epitélio glandular para posterior secreção do histotrofo.

Durante a fase inicial do diestro ocorre a maioria das mitoses nas glândulas endometriais, proliferação singular da espécie equina. No 6 dia, os níveis de E_2 são baixos e os de P_4 máximos, fatos associados à máxima expressão dos receptores esteróides nas células epiteliais, fundamentalmente no epitélio glandular (BRUNKHORST et al., 1991; RAILA et al., 1998; AUPPERLE et al., 2000; KALPOKAS et al., 2010).

O embrião equino pré-implantação produz esteróides e particularmente os estrógenos em quantidades consideráveis para melhorar suas funções na manutenção da prenhez (ZAVY et al., 1979; FLOOD et al., 1979). Diferentemente do suíno, descartou-se que esta molécula seja a sinalizadora do RMP (KLEIN; TROEDSSON, 2011b), porém, existem outras funções que justificariam a produção embrionária deste hormônio a partir do dia 10. Os estrógenos embrionários seriam responsáveis pela estimulação da migração embrionária, além de mudanças na contratilidade uterina, e na atividade secretora glandular endometrial (STOUT; ALLEN, 2001; MERKL et al., 2010).

2.4 Expressão de hormónios e genes no útero a partir do dia da ovulação

A ciclicidade reprodutiva nas éguas é regulada pela regressão do corpo lúteo induzido pela $PGF_{2\alpha}$, que é secretada por pulsos no final do ciclo estral. Durante a

gestação precoce, o conceito impede esta secreção, evitando assim a lise do CL e mantendo a produção de progesterona. A enzima fosfolipase A2 (PLA2) cataliza a secreção de ácido araquidônico pelos fosfolípidos de membrana e sua atividade aumenta durante a luteólise, diminuindo nas éguas prenhes. Recentemente, uma proteína de 17 – kDa, identificada como um tipo IIA sPLA2 , foi detectada ligada às cápsulas embrionárias equinas normais e aumentou substancialmente em resposta à injeção de PGF_{2α}. O número de células positivas pela imunohistoquímica a esta enzima foi elevada durante o estro, diminuiu a níveis basais no dia 8. Não houve diferença significativa entre as concentrações de éguas prenhes e vazias mas foram achadas nas éguas cíclicas no dia 15, com concentrações baixas de P₄. Os níveis de mRNA cPLA2 aumentaram significativamente quando as concentrações de P₄ diminuam abaixo dos 3,18 nM, durante o estro e em algumas éguas cíclicas no dia 15 pós ovulação (ABABNEH et al., 2011).

A concentração de progesterona tem níveis basais no dia da ovulação e aumenta no dia 3 (4.1-11.2 ng/ml) e atinge no nível máximo no dia 8 (14.8-30.0 ng/ml), em éguas vazias. A expressão gênica do endométrio entre os dias 3 a 8 pós ovulação - fase lútea, é relacionado a funções e processos metabólicos secretores e de junção celular. No dia 3 se agrupam genes com função de proliferação celular, biogênese ribossomal e mitocondrial. O receptor de componente da membrana P4-1 (PGRMC1) apresenta-se elevado no dia 8. Este gene é considerado um dos genes “de resposta tardia à P₄”, que possui atividade no transporte de proteínas, ao retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, que dão sinais para processos metabólicos como os de monossacarídeos e lipídios. No dia 10, o gene do receptor gama relacionado ao estrógeno (ESSRA), encontra-se no nível mais alto, regulando a recepção dos hormônios e compartilhando genes alvo e proteínas corregulatórias com o mRNA do receptor específico de estrógeno (ESR). As funções destes genes indicam que o endométrio está se preparando para a manutenção do embrião para o seu crescimento e desenvolvimento (GEHARBT et al., 2012).

O endométrio é um tecido complexo, que consiste de diferentes camadas de células e o objetivo da sua ciclicidade é se preparar para a implantação do embrião. A interação entre as prostaglandinas e os esteróides ovarianos representa um papel crucial nestes processos complexos. Os esteróides ovarianos afetam a morfologia e

função do endométrio. O E_2 regula o comportamento sexual, melhora a motilidade uterina e promove a atividade secretora do trato reprodutivo, enquanto a P_4 afeta a secreção endometrial, promove a manutenção da prenhez, inibe o hormônio liberador das gonadotrofinas e o comportamento reprodutivo. As prostaglandinas atuam localmente modulando processos biológicos do endométrio, como a proliferação celular, angiogênese, implantação embrionária ou, periféricamente, no corpo lúteo (SZÓSTEK et al., 2014).

Trocas cíclicas do endométrio são processos complexos governados pela ação recíproca das diferentes vias que regulam o crescimento e a proliferação celular, onde os esteroides ovarianos tem um papel fundamental. Eles acionam as prostaglandinas (PG), modulam a resposta celular do endométrio às interleucinas (IL) e estimulam a produção de prostaglandinas pelas células epiteliais como pelas células do estroma. O E_2 pode modular a resposta endometrial à IL, mais especificamente à IL-1 e IL-6. A resposta do endométrio a estes fatores é resultado da atividade das células epiteliais e do estroma. A influência dos esteroides ovarianos na produção estimulada pela IL-6 de PG é dependente do tipo da célula e da PG, a qual aumenta no caso da PGE_2 pelas células do estroma (SZÓSTEK et al., 2014).

O mRNA do receptor de estrógeno beta ($E\beta$) foi detetado no embrião no dia 7, 10, e 14. A expressão do mRNA para receptores de P_4 foi maior no dia 7 do que no dia 14. (RAMBAGS et al., 2008)

2.5 O útero a partir da entrada do embrião

O embrião entra no útero entre os dias 5.5 e 6.5 pós-ovulação (BATUT et al., 1997; SAMPER, 2009; McCUE; SQUIRES, 2015) e se movimenta livremente pelo lúmen endometrial até o dia 16, fixando-se então na parede de um dos cornos uterinos (GINTHER, 1983; GASTAL et al., 1996). O aumento do fluxo sanguíneo endometrial é associado com a presença do concepto durante a fase de mobilidade

da prenhez precoce na égua (SILVA et al., 2005; SILVA; GINTHER, 2006). A composição e a qualidade do meio ambiente uterino são pontos críticos para o contínuo suporte e desenvolvimento do conceito pelo que o endométrio muda rapidamente (CROSSET et al., 1996).

Com a entrada do embrião no útero diversas mudanças ocorrem no endométrio. A partir do 7º dia de gestação ocorre uma redução das células ciliadas em relação a éguas no 7º dia do diestro, diminuindo constantemente no transcorrer dos dias. Na égua gestante com sete dias, há presença de células secretórias com microvilosidades ingurgitadas e é possível observar a presença de material histotrófico encobrendo algumas áreas do epitélio. A quantidade de secreção aumenta consideravelmente, deixando as células ciliadas submersas. Algumas células secretórias alongam-se distintamente (KEENAN et al., 1991; MATTOS et al., 2015).

Entre os dias 2-5 pós ovulação éguas prenhes apresentam epitélio mais alto do que o observado em éguas no diestro (KEENAN et al., 1987). Entretanto, entre os dias 6-9 ocorre um aumento na presença de linfócitos e eosinófilos nas éguas prenhes, sugerindo que os linfócitos são uma resposta imunológica ao contato inicial do embrião e que os eosinófilos seriam os moduladores desta resposta (KEENAN et al., 1991; MARTÍNEZ et al., 2016).

Éguas prenhes apresentam valores histomorfologicos mais altos do que as cíclicas no epitélio, diâmetro, lúmen e secreções glandulares, a partir do 7º dia da prenhez, diminuindo o epitélio e o diâmetro nos dias 10 e 13. A presença de linfócitos e eosinófilos foi significativamente maior nas éguas prenhes no 7º dia do que nas éguas cíclicas, reduzindo a sua presença nos dias 10 e 13, sendo estes acontecimentos endometriais associados à prenhez precoce (MARTÍNEZ et al., 2016).

2.6 Histologia normal do útero

O útero equino está composto de três camadas. A camada interna ou mucosa, ou endométrio, que não é decídua. A segunda camada, intermediária, é o miométrio com fibras circulares internamente e longitudinais externamente. A terceira e mais externa camada uterina é o perimétrio. Uma biópsia endometrial geralmente consiste só da porção de prega endometrial, e eventualmente pode conter a porção basal da lâmina própria e até parte da camada circular do miométrio (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978).

O endométrio é composto de duas camadas: o epitélio luminal e a lâmina própria que se estende da membrana basal do epitélio até a camada circular interna do miométrio. O epitélio luminal é composto de células cubóides a colunares altas que residem na membrana basal, que varia na altura de acordo com a fase do ciclo estral. Menos de um terço das células é ciliada (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978).

A lâmina própria é composta de duas camadas que se mesclam imperceptivelmente entre elas, e divididas para melhor descrição baseada na população de células do estroma. O estrato compacto (EC) que sustenta o epitélio luminal, tem cerca 0,75 à 1 mm de espessura. O EC é caracterizado por relativamente alta concentração de células do estroma e numerosos capilares juntos à membrana basal. As células do estroma são estreladas, irregulares, com núcleo oval a redondo e modesto citoplasma. Entre elas existe a rede de reticulina, ou matriz extracelular (MEC) de colágeno tipo III. O estrato esponjoso (EE) tem menor densidade celular de estroma que lhe confere um aspecto esponjoso. Normalmente este espaço fica preenchido de fluído tissular. Os vasos no EE são capilares, arteríolas, vênulas e ocasionalmente pequenas artérias musculares, havendo também vasos linfáticos presentes no EE (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978).

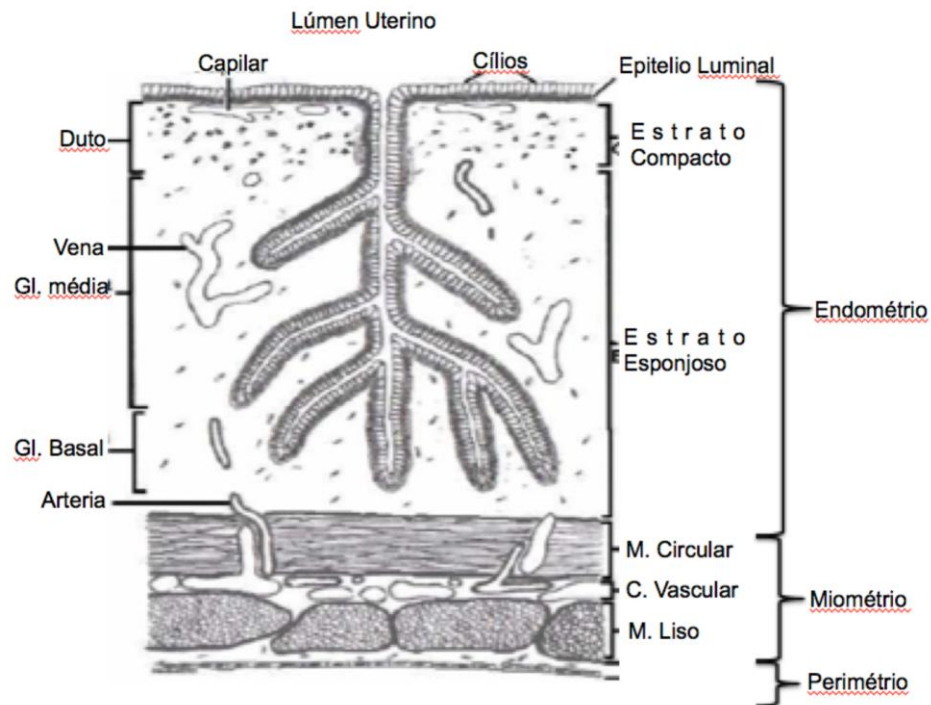


Fig. 1. Diagrama esquemático das camadas uterinas (Kenney, 1978).

A presença de numerosas glândulas uterinas é característica marcante da lâmina própria, sendo estas originadas e conectadas ao epitélio luminal por ductos. Os ductos são usualmente simples e sem ramificações, e estão localizados integralmente no EC. As demais porções das glândulas estão inteiramente localizadas no EE. As glândulas são divididas em porções média e basal, consistindo de glândula tubular, ramificadas com 10 ou mais ramos primários e outros secundários (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978).

Durante o estro, o epitélio luminal é colunar de médio a alto, variando de simples à pseudoestratificado, resultado da atividade mitótica. Neste período a presença de vacúolo citoplasmático é comum, especialmente no terço basal da célula. Encontrando, também nessa fase edema, congestão vascular e infiltrado leucocitário (RICKETTS, 1978). A densidade glandular por unidade de área é menor no estro do que em outras fases como resultado do edema endometrial,. As glândulas são menos tortuosas que durante o diestro (KENNEY, 1978).

Na fase de diestro, o epitélio luminal é colunar baixo. O edema do estroma está diminuído ou ausente durante o diestro; como resultado, a densidade glandular

normalmente aumenta e as glândulas aumentam sua tortuosidade provavelmente como resultado de aumento no comprimento. A hiperplasia glandular é o aumento do número de células do epitélio glandular que pode provocar um aumento no comprimento e tortuosidade glandular bem como aumento no número de ramos das glândulas (KENNEY, 1978).

A hiperplasia glandular é esperada no diestro e gestação por efeito da progesterona, mas algumas condições patológicas na égua, como a fibrose periglandular, também promovem hipertrofia do epitélio glandular como resposta (KENNEY, 1978).

Eventos comuns aos encontrados durante o diestro e na gestação inicial em equinos foram relatados por Keenan et al. (1987). Presença de epitélio cubóide e colunar simples ou pseudoestratificado, vacúolos celulares, presença de leucócitos no estroma, adensamento de glândulas foram descritos no diestro e na gestação até os 21 dias. Entretanto, apenas nas éguas gestantes foi relatada a presença de pleomorfismo celular do epitélio superficial.

A análise histomorfométrica do endométrio foi utilizada para avaliar a altura do epitélio luminal e glandular; densidade glandular e luminal; e a porcentagem de glândulas com lúmen e com secreção intraluminal, usando um analisador da imagen semiautomático composto por uma câmera e uma tabela digital (MANSOUR et al., 2014).

2.7 Microscopia eletrônica do útero

A microscopia eletrônica de varredura já foi utilizada para estudar a anatomia de superfície do útero de mulheres (JOHANNISSON; NELSON, 1972), coelha (KANAGAWA et al., 1972), éguas (SAMUEL et al, 1979) e ratas (SANFILIPPO et al., 1985).

O endométrio da égua apresenta dobras com longas cristas e canais, com células ciliadas ao redor das aberturas das glândulas. As células com microvilosidades, com formato claramente poligonal, são as mais comuns durante o ciclo estral. As células ciliadas apresentam uma superfície arredondada, sendo completamente coberta por cílios. As células prociliadas provavelmente são células ciliadas em desenvolvimento. As células secretoras poligonais apresentam ampolas apicais com quantidades variáveis de aberturas (SAMUEL et al., 1979).

Na burra observam-se dobras endometriais orientadas em formato irregular no corpo do útero, no entanto nos cornos a organização é em formato longitudinal e paralela. As aberturas das glândulas uterinas estão localizadas nas zonas profundas das depressões, com poucas localizadas nas dobras. A maior quantidade de células apresenta formato poligonal na sua superfície apical. As diferentes regiões apresentam variações entre os tipos celulares, células ciliadas e as células com microvilosidades (as mais comuns). Algumas células secretórias apresentam ampolas apicais, que podem apresentar superfícies lisas e enrugadas (ABD-ELNAEIM, 2008).

No diestro, o número de células secretórias é baixo na égua, no entanto as células ciliadas se apresentam em maior número no diestro médio, diminuindo quando se aproxima o final do diestro, sempre em níveis maiores do que no estro. As células prociliadas apresentam-se no início do diestro médio. Em cada dobra há sulcos menores que conferem uma superfície ondulada com topos e calhas. As células epiteliais secretoras, variam entre planas ou protuberantes ingurgitadas ocupando a maior parte da superfície, havendo algumas delas erodidas provavelmente por recente secreção de vesículas. As aberturas das glândulas se apresentam nas cristas das dobras. Pouco material histotrófico se encontra acumulado, apenas entre as criptas (SAMUEL et al., 1979; WINTER et al., 2014).

Na endometrite, o epitélio apresenta respostas variadas, geralmente com falha na superfície da membrana das células com microvilosidades, perda de cílios, cílios aderidos, perda de células individuais deixando orifícios no epitélio e presença de fragmentos. Em casos de atrofia uterina observam-se tanto microvilosidades como células ciliadas, ao lado de células secretoras, que apresentam ampolas secretoras encarquilhadas; algumas das microvilosidades se perdem em parte da

célula. No útero hipoplásico se observam células ciliadas e com microvilosidades normais, mas sem células secretoras (SAMUEL et al., 1979).

3. ARTIGO

Alterações na arquitetura e na estrutura do endométrio na Égua no 5º Dia Pós-Ovulação

Autor: Jorge Emilio Caballeros Haeussler

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

RESUMO

Rápidas adaptações endometriais ocorrem com a chegada do embrião no útero para criar um ambiente uterino receptivo, que é essencial para o desenvolvimento do concepto. As descrições dos eventos endometriais que ocorrem antes da chegada do embrião ao útero, são escassas. O objetivo deste experimento foi demonstrar mudanças na arquitetura e na estrutura do endométrio que ocorrem no dia 5 pós-ovulação em éguas cíclicas e inseminadas. Amostras de biopsia endometrial foram recolhidas em torno do dia 5 pós-ovulação em um grupo de 10 éguas reprodutivamente saudáveis, uma de cada corno, durante dois ciclos. No primeiro como 'Cíclicas' (n = 10) e no seguinte estas mesmas foram inseminadas para formar o grupo 'Inseminadas' (n = 10). As éguas inseminadas foram subdivididas em dois subgrupos: aquelas em que as amostras foram recolhidas antes do dia 5.5 e aquelas em que as amostras foram recolhidas depois do dia 5.5. As biopsias endometriais foram analisadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A densidade, o diâmetro, o epitélio, o lúmen e a secreção glandular, foram submetidos à análise histomorfométrica. As células brancas foram avaliadas em uma contagem diferencial. As células ciliadas, poligonais com microvilosidades, e a presença de células planas ou ingurgitadas no epitélio, na microscopia eletrônica de varredura, foram analisados por uma contagem individual de cada um dos tipos celulares.

Houve um aumento no diâmetro glandular, uma diminuição significativa nas células ciliadas e um aumento significativo na população de linfócitos nas éguas inseminadas, quando comparadas com as égua cíclicas. Na análise dos subgrupos de éguas inseminadas, não houve diferenças nas variáveis. Estes resultados levam a concluir que mudanças significativas ocorrem no endométrio no dia 5 pós ovulação, na égua inseminada.

Palavras-chave: Célula ciliada, diâmetro glandular, linfócito, embrião.

Mare Endometrial Architectural and Structural changes at Day 5 post-ovulation

ABSTRACT

Rapid endometrial adaptations occur as the embryo enters the uterus to create a receptive uterine environment, which is essential for the conceptus' development. Descriptions of endometrial events before the embryo reaches the uterus, are scant. The aim of this experiment was to demonstrate architectural and structural changes in the endometrium on day 5 after ovulation in cyclic and inseminated mares. Endometrial biopsy samples were taken during day 5 post-ovulation from a group of 10 reproductively healthy mares, one from each uterine horn, during two cycles. The first one they were considered as 'cyclic' (n = 10), and in the following one, the same mares were inseminated to constitute the 'inseminated' group (n = 10). Inseminated mares were subdivided into two subgroups: those sampled before day 5.5 and those sampled after day 5.5. Biopsy samples were analyzed through optic microscopy and scanning electron microscopy. Glandular density, diameter, epithelial height, lumen, and secretion were analyzed through histomorphometry. White blood cells were evaluated through a differential cell count. Ciliated cells, micro-ciliated polygonal cells, and flat or protruded cells over the epithelium, on scanning electron microscopy, were analyzed through an individual cell type count. Inseminated mares presented an increase in glandular diameter, significant decrease in ciliated cell population, and a significant increase in lymphocyte population, compared to cyclic mares. No differences in any of the variables were detected between subgroups from inseminated mares. The results here presented lead to the conclusion that significant endometrial changes occur on day 5 post-ovulation in inseminated mares.

Key-words: Ciliated Cell, glandular diameter, lymphocyte, embryo.

INTRODUCTION

Early pregnancy in the mare is a fascinating period that encompasses numerous profound developmental changes and events, many of which are unique to the horse (STOUT, 2009). The slow passage of the equine embryo through the oviduct and the differential transport of oocytes and embryos within the equine oviduct are some of these unusual features (ALLEN, 2005).

The equine embryo passes all the way down the oviduct to enter the uterus through the protuberant utero-tubal papilla after day 5.5 post-ovulation, starting its mobility through all the uterine segments (BATUT et al., 1997; SAMPER, 2009; McCUE; SQUIRES, 2015). Conceptus mobility throughout the uterus clearly plays an important role in altering $\text{PGF}_{2\alpha}$ production at the time of maternal recognition of pregnancy in horses (MCDOWEL; SHARP, 2012). Also, migration allows the conceptus to accumulate a range of proteins and other components of endometrial gland secretions onto its surface (ALLEN, 2001). At that stage, the nonattached conceptus is sustained entirely from the exocrine secretions of the endometrial glands (LEFRANC; ALLEN, 2007). Early conceptus development, implantation and maintenance of pregnancy are critically dependent upon a precisely orchestrated interaction between the conceptus and the uterine environment (KLEIN; TROEDSSON, 2011a).

A rapid endometrial adaptation occurs with the embryo entering the uterus. On day 7 of gestation, ciliated cell population decreases compared to mares on the same day of diestrus, and continues to decrease as gestation progresses (KEENAN et al., 1991; MATTOS et al., 2015). Also, on day 7 of pregnancy, it is possible to observe histotrophic material covering some epithelial areas of the endometrium, and protruded secretory micro-ciliated cells. The amount of secretion increases considerably with the advance of pregnancy, leaving ciliated cells submerged, and some secretory cells become elongated (MATTOS et al., 2015).

Pregnant mares presented endometrial transformations, which resulted in higher histomorphometric values on day 7 of pregnancy, with larger glandular diameter, epithelial height, lumen and secretions than cyclic mares. Also, an

increased presence of lymphocytes and eosinophils was observed in pregnant mares when compared to control mares (KEENAN et al., 1987; MARTÍNEZ et al., 2016). Probably these lymphocytes are related to an immune response to the initial contact with the embryo, and the eosinophils are thought to be response modulators (KEENAN et al., 1987; MARTÍNEZ et al., 2016).

Descriptions of endometrial events at day 5 post-ovulation, before the embryo reaches the uterus, are scant. The aim of this experiment was to demonstrate architectural and structural changes of the endometrium at day 5 after ovulation in cyclic and inseminated mares.

Material and Methods

Animals

The present experiment was conducted in the south of Uruguay during the southern breeding season (February to March), using 10 cyclic Quarter Horse mixed-breed mares from a commercial herd. Mare's ages ranged from 4 to 10 years, weighting between 450 and 550 Kg, with mean body condition score of 3 (in a range from 1 to 5) (Malschitzky et al. 2001). Mares were kept in natural pastures and supplemented with alfafa hay and oats. Animals were given free access to water and received *ad libitum* mineral supplementation. Mares did not present any history of fertility problems. Their reproductive status was evaluated through physical examination and ultrasound (Sonoscape S6, Shenzhen, China).

This study was carried out following an Animal Ethical Use Committee approved protocol from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (protocol number 27316 from April 17, 2014).

Reproductive Management

Mares were examined daily by transrectal palpation and ultrasonographic examination. When a corpus luteum was detected, estrus was induced with 5 mg dinoprost tromethamine IM (Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil).

Once estrus was confirmed and a follicle > 35 mm in diameter and marked uterine edema were evidenced (Ginther; 1986), mares were monitored every 24 h until ovulation was detected. Ovulation was considered day 0. Biopsy samples were performed at day 5 after ovulation in all mares (n = 10). Samples were obtained from each uterine horn near the bifurcation (n=20). These samples constituted the 'Cyclic Group'. On day seven all mares were administered 5 mg dinoprost tromethamine IM to induce a new estrus.

Mares were monitored daily by transrectal palpation and ultrasound. At the second estrus, when a pre-ovulatory follicle (> 40 mm) was observed in association with a reduced grade of uterine edema (Ginther; 1986), mares were inseminated with fresh semen from a fertile stallion (> 80% fertility during breeding season), with 800×10^6 sperm cells. Examinations continued until ovulation confirmation, considered day 0. At day 5, biopsy samples were collected from both horns (n = 20), close to the bifurcation, in all mares (n = 10). These samples constituted the 'Inseminated Group'.

The time interval between ovulation and biopsy ranged from 5 to 5.5 days in five mares from the Inseminated Group, and they constituted the subgroup '< 5.5 d'. Another five mares were sampled at an interval from 5.5 to 6 days and constituted the subgroup '> 5.5 d'.

Biopsy samples from the Cyclic and Inseminated Groups were divided in two parts: one, stored on a 2.5% glutaraldehyde solution, used for Scanning Electron Microscopy studies; and another stored on a 4% buffered paraformaldehyde solution, used for histology studies.

Scanning Electron Microscopy

Tissues from both groups were fixed on a 2.5% glutaraldehyde solution on a phosphate buffer 0.1 M pH 7.4. After fixation, fragments were washed three times in phosphate buffer for 30 min each. Afterwards, samples were dehydrated on increasing concentrations of PA acetone, at 30%, 50%, 70%, for 10 min each, followed by PA acetone at 90% for 10 and 20 min and PA acetone at 100% for 10 and 20 min. Then samples were dry dehydrated on a CO₂ critical point dryer (Critical Point Dryer CPD030 – Balzers), and then positioned and adhered with a double sided carbon tape over a metallic stub to be coated with 20 nm of gold and carbon (Sputter Coater SCD050 – Balzers). A JSM 6060 (JEOL) scanning electron microscope, operated on an electron beam between 8 kV and 10 kV, was used. Images were saved as TIFF (Tagged Image File Format).

Five magnifications were used to capture images: 500 x, 1000 x, 1500 x, 2000 x and 3000 x. At 500 x, images from five randomly selected fields were evaluated, and to avoid errors in quantification and structure identification, 1000 x and 1500 x magnifications were used. Images in 2000 x and 3000 x were used for graphic purposes and to study structure's appearance.

The five 500 x images from each biopsy sample were divided with a grid containing 20 squares measuring 50 x 50 µm each. Five squares were randomly selected for evaluation, resulting in 25 quantifications per sample. In each square the number of the different cells types (micro-ciliated polygonal cells, ciliated cells, and percentage of flat or protruded cells in the epithelium) was counted. Also, the level of secretion over the epithelium was evaluated, using a subjective scale ranging from 1 to 5, where 1 represents no secretion and 5 maximum secretion,. Quantification was done using FIJI image analyzing software (ImageJ®, National Institutes of Health, Maryland, USA). After quantification, a mean was established per each variable, for each mare.

Histology

Samples from both groups conserved in paraformaldehyde were conditioned to be included in paraffin. Paraffin blocks were cut with an automated microtome (Leica, RM165) at a 5 μm thickness, adhered in histology slides and kept on a 60°C incubator. After deparaffinization, cuts were colored using routine techniques for tissue samples (TOLOSA et al., 2003), using hematoxylin eosin (HE). Samples were then histologically evaluated.

Histological analysis was performed using an optic microscope (DM500, Leica Microsystems GmbH, Germany), with an attached capture camera (ICC500 HD, Leica Microsystems GmbH, Germany), and an image acquisition software (LAS EZ, Leica Microsystems GmbH, Germany).

From each sample, 3 fields were observed at 100 x to evaluate glandular density in both the *stratum spongiosum* and the *stratum compactum*; quantifying the amount of glands per stratum in each field. After quantification of the 3 fields, an average was calculated per each sample.

Glandular diameter, glandular lumen, and glandular epithelium were assessed in 9 fields at 400 x, evaluating and at least 5 glands per field. Glandular diameter was considered as the average between two perpendicular measurements of the distance between one basement membrane and the opposite one. Glandular lumen diameter was defined as the space between both apical membranes, and considered as the average between two measures taken perpendicularly. Glandular epithelium height was measured by taking the distance from the basement membrane to the apical membrane in one or two zones that represented the epithelium's mean height, calculating an average for each gland.

Glandular secretion was evaluated in 9 fields at 400 x, and estimated based on a scale from 1 to 5, where 1 represents no secretion and 5 maximum secretion. A mean was estimated for the nine images per sample.

White blood cells were counted in 9 fields at 400 x, doing differential cell quantification per *stratum*. After evaluating all 9 images a mean was estimated for each sample.

Blood vessel diameter was measured in 3 fields at 100 x and an average was calculated from each sample.

When all of the measurements were gathered a mean for each variable was calculated for each sample. Measurements were done using the FIJI image analyzing software (ImageJ®, National Institutes of Health, Maryland, USA).

Statistical Analysis

Variables were evaluated using the Statistical Analysis System (SAS, Cary, NC, USA). Micro-ciliated polygonal cells, ciliated cells, percentage of flat or protruded cells in the epithelium, level of secretion over the epithelium, glandular density in the *stratum spongiosum* and the *stratum compactum*, blood vessel diameter, glandular diameter, glandular epithelium, glandular lumen diameter, glandular secretion, and lymphocytes, eosinophils, monocytes, and neutrophils in the *stratum spongiosum* and the *stratum compactum* were considered as dependent variables. Group, 'Inseminated' or 'Cyclic', and the subgroups, '< 5.5 d' and '> 5.5 d', were considered as independent variable. Variables were evaluated for normality using the PROC UNIVARIATE procedure, those not meeting normal distribution were transformed using natural logarithm and those still not meeting normality by this method were evaluated by non-parametric statistics.

Variables with normal distribution were analyzed using the PROC GLM procedure, which evaluates non balanced variables, testing for interactions between horn (ipsilateral or contralateral to the ovulation) and treatment (cyclic or inseminated), and if these had a statistical effect on the variables. Means were evaluated using Tukey's test, using the LSMEANS procedure. Variables not meeting normal distribution were analysed by the PROC NPAR1WAY procedure, to evaluate the means by Wilcoxon e Kruskal-Wallis tests. A paired T test was conducted to compare the subgroups ('< 5.5 d' and '>5.5 d') using the PROC TTEST procedure. Differences $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

In Cyclic and inseminated mares, ciliated and micro-ciliated polygonal cells were clearly identified; the later were either protruded or flat. Epithelium was presented in a folded fashion with minor sulci and with a low presence of glandular openings. Little endometrial secretion was identified over the epithelium in mares from both groups (Fig. 1).

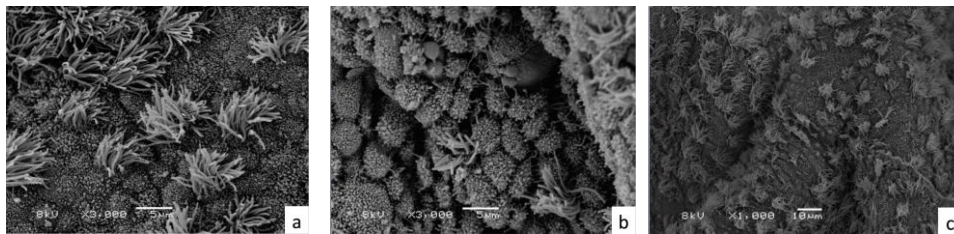


Fig. 1. Electromicrographs showing cellular types composing epithelial surface of the endometrium: ciliated and micro-ciliated polygonal cells (a), protruded cells (b), folded epithelium with minor sulci showing both types of cells, ciliated and micro ciliated polygonal cells (c).

Glandular diameter increased ($P = 0.008$) in the 'Inseminated Group' ($56.3 \pm 5.9 \mu\text{m}$) compared to the 'Cyclic Group' ($50.5 \pm 7.2 \mu\text{m}$) (Fig. 2 and Fig. 3A). Nevertheless, no difference ($P = 0.354$) was observed when comparing inseminated mares sampled in subgroups '< 5.5 d' and '> 5.5 d' (Fig. 3B). Glandular density was not affected statistically by insemination neither at the *stratum spongiosum* nor at the *stratum compactum*. Also, glandular luminal diameter ($P = 0.258$), glandular epithelium height ($P = 0.241$), glandular secretion ($P = 0.224$), and blood vessel diameter ($P = 0.647$) did not show differences between groups.

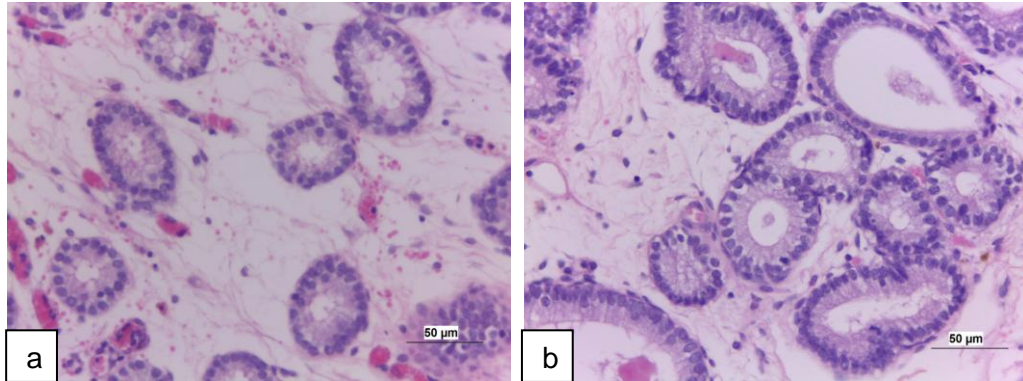


Fig. 2. Photomicrographs of mare endometrium from 'Cyclic' (a) and 'Inseminated' (b) groups, showing glandular diameter and glandular luminal diameter (HE – 400x, bar = 50 μ m)

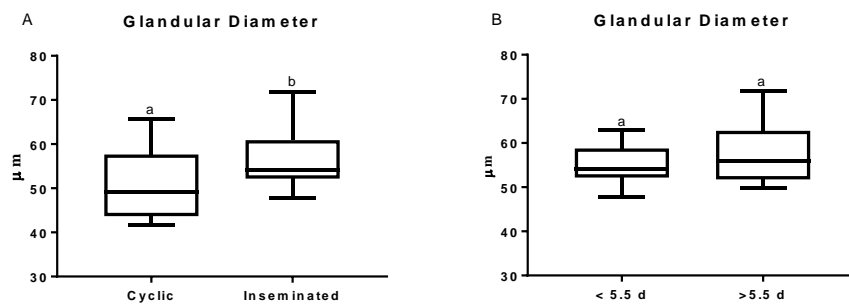


Fig 3. – Boxplots for Glandular diameter from 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 post ovulation (B). Different letters (a, b) represent significant difference ($P < 0.05$).

Ciliated cells decreased ($P = 0.006$) in the 'Inseminated Group' (13.6 ± 5.3 cells/field) compared with the 'Cyclic Group' (19.1 ± 6.5 cells/field) (Fig. 4 and Fig 5A). However, no difference ($P = 0.215$) was observed when comparing inseminated mares in subgroups '< 5.5 d' and '> 5.5 d' (Fig. 3B). No difference was detected between groups in the amount of micro-ciliated polygonal cells ($P = 0.393$), in the amount of secretion over the epithelium ($P = 0.387$), and in the percentage of flat ($P = 0.739$) and protruded cells ($P = 0.951$).

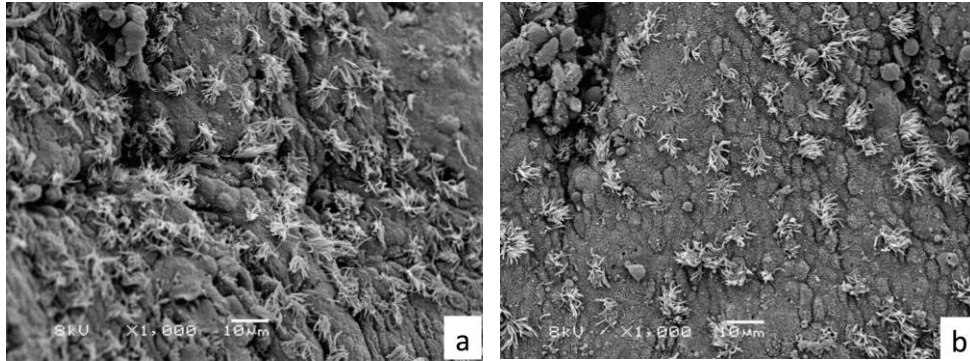


Fig. 4. Electromicrographs (1000 x) showing the amount of ciliated cells in 'Cyclic' (a) and 'Inseminated' mares (b); in both, there is a predominance of micro-ciliated polygonal cells varying between flat and protruded.

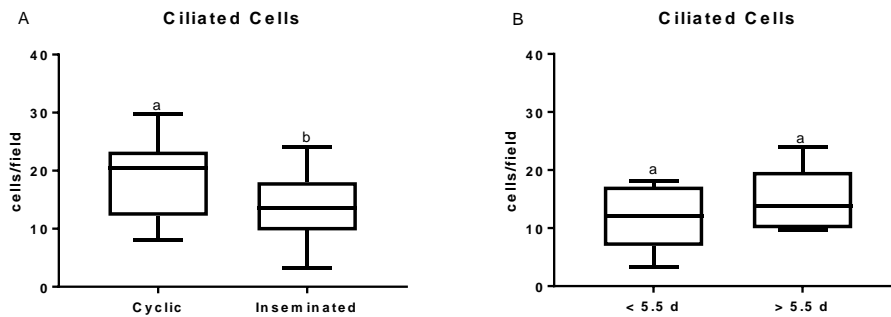


Fig. 5. Boxplots for Ciliated cells observed on Scanning electron microscopy for 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation (B). Different letters (a, b) represent significant differences ($P < 0.05$).

Lymphocytes at the *stratum compactum* increased ($P < 0.001$) in 'Inseminated' mares (9.2 ± 1.6 cells/field) when compared to 'Cyclic' mares (7.1 ± 1.6 cells/field) (Fig. 6 and Fig. 7A). There was also an increase ($P < 0.001$) in Lymphocytes at the *stratum spongiosum* in 'Inseminated' mares (8.6 ± 1.3 cells/field) compared to 'Cyclic' ones (6.4 ± 1 cells/field) (Fig. 6 and Fig. 8A). No difference was observed comparing inseminated mares sampled in subgroup '< 5.5 d' and mares sampled in subgroup '> 5.5 d' post ovulation neither at the *stratum compactum* ($P = 0.810$) (Fig. 7B) nor at the *stratum spongiosum* ($P = 0.730$) (Fig 8B). There was neither influence nor interaction between horn and treatment.

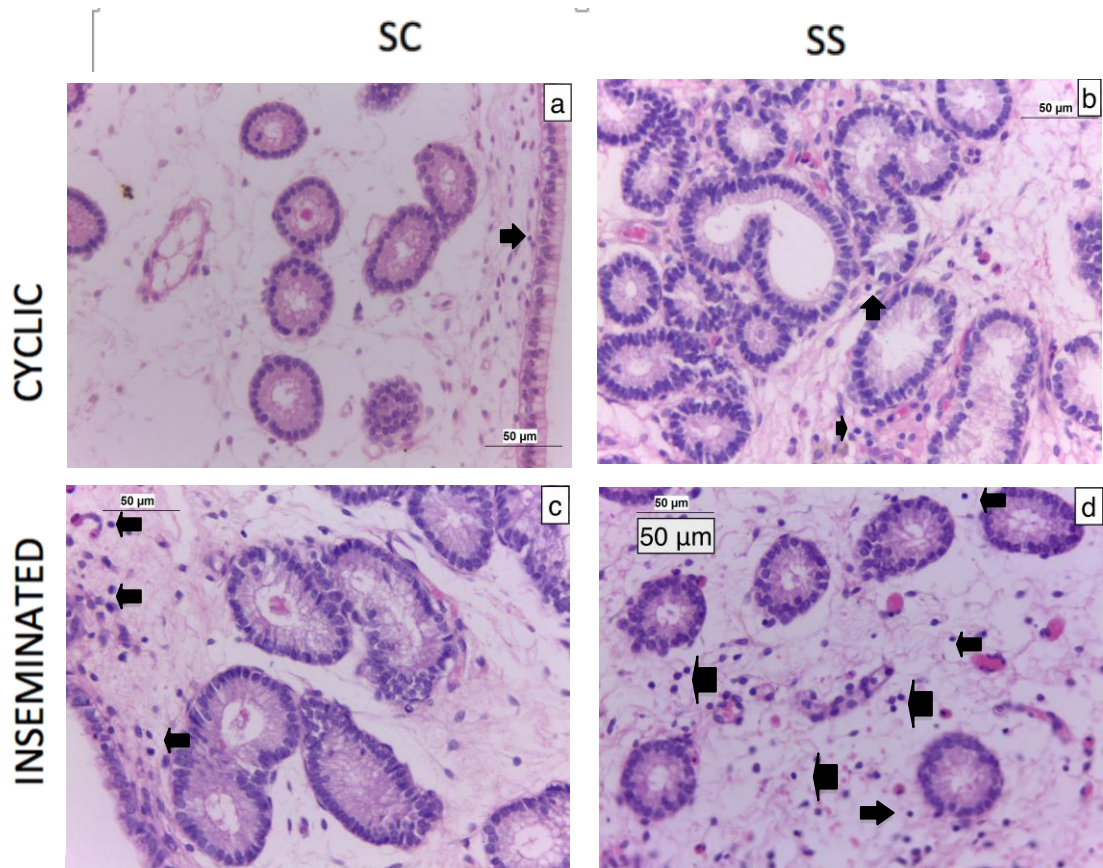


Fig. 6. Photomicrographs of the endometrium from 'Cyclic' (a and b) and 'Inseminated' (c and d) mares, from the *stratum compactum* (a and c) and the *stratum spongiosum* (b and d); showing the amount of lymphocytes (black arrows) from both strata in 'inseminated' compared to 'cyclic' mares. SC = *stratum compactum*; SS = *stratum spongiosum* (HE – 400x, bar = 50μm).

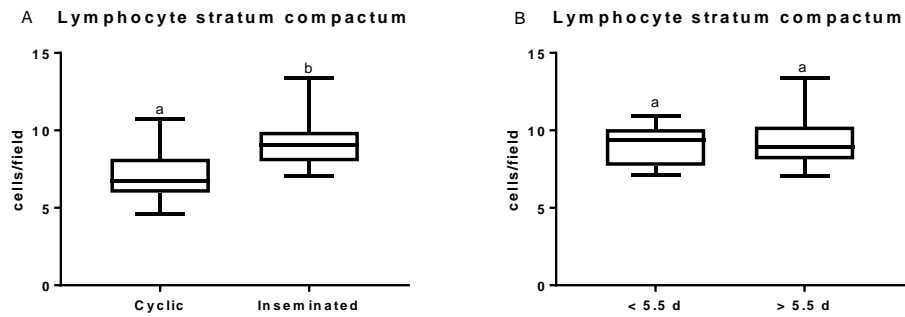


Fig. 7. Boxplots for Lymphocytes at the *stratum compactum* from 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation (B). Different letters (a, b) represent statistical difference ($P < 0.05$).

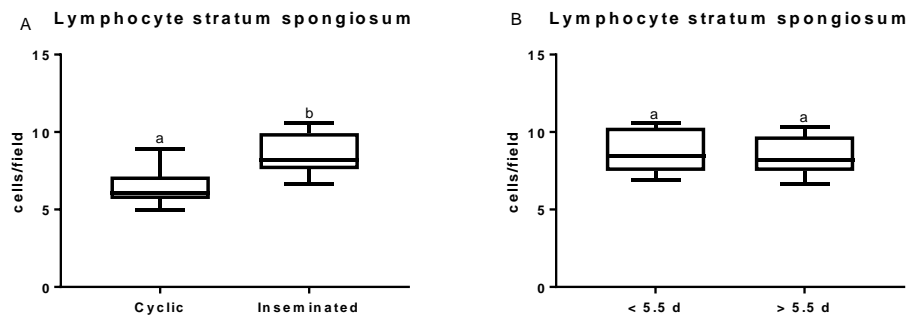


Fig. 8. Boxplots for Lymphocytes at the *stratum spongiosum* from 'Cyclic' and 'Inseminated' mares (A), and in inseminated mares sampled < 5.5 d and > 5.5 d post ovulation. Different letters (a, b) represent statistical difference ($P < 0.05$).

There was no difference between treatments in the number of eosinophils ($P=0.592$), neutrophils ($P=0.443$), and monocytes ($P=0.342$).

Neither statistical difference was observed when comparing variables by *ipsi* or *contra* lateral horn relative to ovulation, nor interaction between horn and treatment.

DISCUSSION

The present study evidences endometrial adaptations between days 5 and 6 post-ovulation in inseminated mares, comparing them with mares in the same day of diestrus. Optic microscopy showed that glandular diameter increased, and there were more lymphocytes in the *stratum compactum* and the *stratum spongiosum* in the inseminated mares. In this group of mares, scanning electron microscopy revealed a decrease in ciliated cell population.

The equine embryo reaches the uterus after day 5.5 (BATUT et al., 1997; SAMPER, 2009; McCUE AND SQUIRES, 2015), therefore, in this study embryos could not be collected from inseminated mares to confirm pregnancy. No difference in glandular diameter, lymphocytes and ciliated cells were detected between inseminated mares sampled prior and after day 5.5 post-ovulation. Probably the changes here presented are events that happened prior to the hypothetical entry of the embryo into the uterus.

Embryos which implantation occurs over an extended period are reliant upon nutritive substances in the uterine lumen for their survival and growth (ASHWORTH et al., 1995). With the significant increase in glandular diameter during the fifth day of the inseminated mares, there is evidence that the uterus is preparing itself to maintain the embryo previous to its entrance until the implantation. These results can be compared with those presented by Martínez et al. (2016) that show glands with larger diameter, lumen and epithelium associated with accumulation of intraglandular secretions, in mares at 7 days of pregnancy compared with mares in the same day of diestrus. A rise in glandular epithelial height on pregnant mares between two to five days post-ovulation was reported by Keenan et al. (1987). However, those results were not observed in the present study, but this difference might come from the wide range of days that they used for sampling, since it can be a reflection of the natural cellular proliferation pattern. On day 3 of diestrus, increased mitotic activity in the secretory portions of the endometrial glands epithelial cells is observed, however, by day 5 there is almost no mitotic activity (GESTENBERG et al., 1999). In spite of the increase of the glandular diameter observed in this study, no increase in the amount of glandular secretion was detected, as observed by Martínez et al. (2016) after the

arrival of the embryo in the uterus. The low secretion may be explained because embryonic estrogens have been proposed to be responsible for endometrial glandular secretion (STOUT; ALLEN, 2001; MERKL et al., 2010). The extended period of the equine embryo oviductal transport may be related to a need for the secretory epithelium of the endometrial glands to proliferate before it is able to secrete sufficient histotrophe (GESTENBERG et al., 1999). It can be hypothesized that these adaptive changes are happening gradually, before the embryo reaches the uterus, and that the increased glandular diameter is necessary to the future epithelial growth and glandular secretion, which will entirely nourish the embryo.

Inseminated mares, in contrast to cyclic ones, showed a significant decrease in ciliated cell population, with no differences regarding the number of micro-ciliated polygonal cells. This decrease was already reported comparing mares in mid diestrus with pregnant mares in the same stage post ovulation, but sampling day was not clearly stated (KEENAN et al., 1991); so, the present results reveal this event in a more accurate manner because sampling was restricted to a single day. The observed results are complementary to those presented by Mattos et al. (2015), who stated that starting on day 7, pregnant mares present a decrease in ciliated cells mixed with some secretion in relation to mares in the same day of diestrus. These differences between groups, associated with results of previous observations, reveal the existence of epithelial adaptations to provide an adequate environment for the embryo before it enters the uterus. During this period, contact with endometrial secretions is vital to the conceptus, since it is entirely sustained by them (LEFRANC; ALLEN, 2007). Probably, the loss of the cilia allows the conceptus to harvest nutrients easily onto its surface for its development.

However, there are concerns that sperm induced uterine inflammation (KOTILAINEN et al, 1994) may be responsible for the above-mentioned events. The acute inflammatory response after breeding is a predictable, physiologic event. Endometrial samples that suffered from inflammation presented loss of cilia (SAMUEL et al., 1979). Uterine inflammation must be controlled by 96 h post-ovulation to maximize survival of the embryo (CARD, 2005). A modulatory role on the inflammation has been suggested for equine seminal plasma, shortening the duration, but not the magnitude of polymorphonuclear cells influx into the uterine lumen; there was no significant difference in the number of these cells at 6, 12 and

24 h after insemination when seminal plasma was replaced with a commercial semen extender (TROEDSSON et al., 2001). Semen extender presents a modulatory effect similar to that of seminal plasma on the uterine response to breeding, showing that the present results perhaps were not a result of this residual inflammation induced by semen.

In this experiment, lymphocytes, in the *stratum compactum* and the *stratum spongiosum* are the inflammatory cell population showing an increase on inseminated mares. This fact is consistent with observations reported by Martínez et al. (2016), who observed that mares in the 7th day of pregnancy had an increased number of this cell line, decreasing gradually between days 10 and 13. Keenan et al. (1987) also reported similar findings in pregnant mares between days 6 and 9, when lymphocytes appeared as cellular infiltrates in the *stratum compactum* and as periglandular aggregates in the *stratum spongiosum*. The latter authors suggested that this cell population represents an immunologic response from the uterus to the initial contact with the embryo. This hypothesis does not agree with the present results, since lymphocytes appear before the embryo enters the uterus.

The reciprocal nature of the dialogue between the embryo and the mare's reproductive tract almost certainly begins immediately in the oviduct (BETTERIDGE, 2000). Early equine embryos have been shown to secrete PGE₂ immediately before and during oviductal transport, failing to demonstrate detectable levels of estradiol (WEBBER, 1991). PGE₂ is a well-known immunomediator that has multiple effects on the immune system. It seems to selectively modulate cytokine secretion profiles of human T cells (SNIJDEWINT et al., 1993). It affects tissues in a very specific manner, for example during mucosal inflammation, mucosal T cells up-regulate their expression of certain prostaglandin receptors, reducing its production of IL-2 (HARRIS et al., 2002). Lymphocytes appear to play a role in this communication in response to events in the oviductal and uterine mucosa.

This lymphocyte increase detected in the inseminated mares seems to be important, since in previous studies this cell line was not altered neither in estrus nor in diestrus (WATSON AND DIXON, 1993; WATSON AND THOMPSON, 1996), suggesting the increase may be directly linked to adaptive events related to the embryo.

A new group of lymphocytes called 'innate lymphoid cells' (ILCs) are a functionally diverse but developmentally related family of lymphocytes with phenotypes that resemble those of polarized T cell subsets. ILCs do not require specific antigen or costimulation and are instead activated by an expanding list of soluble mediators that include proinflammatory cytokines, alarmins, lipids and hormones released by stromal, epithelial and myeloid populations. The limited activation requirements of ILCs allow them to serve as first responders. Cytokines derived from them can promote granulocyte migration. Group 1 ILCs are analogous to T_H1 cells as they express the transcription factor T-bet and produce interferon γ (INF- γ); these cells include uterine ILC1s. This group has been linked to the promotion of vascular changes in the uterus during pregnancy (BANDO; COLONNA, 2016). Lymphocytes in this study seem to be part of this new group as they showed a rapid response to the events that might have taken place in the oviduct, and were linked to other uterine events.

The influence of estrogens on immune response is well documented. Data showed intracellular expression of estrogen receptors α and β in all lymphocyte subsets including peripheral NK cells. It has been demonstrated that lymphocytes express a functionally active estrogen receptor α 46 isoform, supporting the idea that estrogen level fluctuations may be associated with a prompt activation of lymphocytes (PIERDOMINICHI et al., 2010). As it has been shown, the equine embryo presents mRNA for estrogen β receptor between days 7 and 14 (RAMBAGS et al., 2008), it is likely that, as they share this receptors with lymphocytes, there might be a paracrine signal being received by this cells, either from the mare or the conceptus.

Eosinophils are not altered between groups. These cells rose significantly in pregnant mares on day 7, also decreasing in posterior days (MARTÍNEZ et al., 2016). This difference in results between experiments suggests that eosinophils represent an immune response to the presence of the embryo within the uterus.

Glandular diameter, epithelium height, and lumen measurements are similar to those presented by other authors who studied cyclic mares (KEENAN et al., 1987; RASCH et al., 1996; MANSOUR et al., 2004). In this experiment cyclic mares

present the typical endometrial epithelium appearance of diestrus mares (SAMUEL et al., 1979; KEENAN et al., 1991).

In summary, changes here observed probably represent a paracrine response caused by the embryo to help uterine environment become more suitable for its survival. Glandular diameter increasing without epithelial growth suggests that glands are preparing themselves to produce substances that will provide the embryo with nutrition. Since glandular proliferation begins in the basement membrane, as cellular proliferation pattern reaches its maximum 4 days post ovulation (GESTERBERG et al., 1999), diameter increases but epithelial growth cannot follow this events. The decrease in ciliated cells, previous to the embryo entering the uterus, might ease the contact between uterus and conceptus as well as with the secretions that will help in its subsequent development. The elevation in lymphocyte population responds to a stimulus previous to embryonic arrival to the uterus rather than to its physical contact with the epithelium, and is not accompanied by eosinophils, as it does on day 7 of pregnancy (MARTÍNEZ et al., 2016). These facts lead to the hypothesis that there is some sort of signaling cascade to prepare and adapt the uterus to maintain pregnancy. There is also evidence to support an alternative hypothesis suggesting that all of the above mentioned are inflammatory events, resulting from a previous inflammation due to residual seminal effects (SAMUEL et al., 1979; FIALA et al., 2007), though this effect might be attenuated by the use of a semen extender (TROEDSSON, et al., 2001). The results here presented lead to the conclusion that significant endometrial changes occur on day 5 post-ovulation in inseminated mares.

4. REFERÊNCIAS

ABABNEH, M. M., ABABNEH, H., SHIDAIFAT, F. Expression of Cytosolic Phospholipase A2 in Equine Endometrium during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. **Reprod Dom Anim** 46, 268–274, 2011.

ABD-ELNAEIM, M. M. Morphological Characteristics of the Donkey (*Equus asinus*) Uterus during Estrus: Light, Scanning and Transmission Electron Microscopic Study. **J of Agricult and Vet Sc.** v. 1. n. 2, p. 47-57, 2008.

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction.** v. 121, n. 4, p. 513-527, 2001.

ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. **Anim Reprod.**, v.2, n.4, p.209-223, 2005.

ASHWORTH, C. J., Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Prod. Sci.** v. 44, p.99-105, 1995.

AUPPERLE, H., OZGEN, S., SCHOON, H. A., SCHOON, D., HOPPEN, H. O., SIENE, H., TANNAPFEL, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Vet J.** v. 32, p.228-232, 2000.

BALL, B. A. Embryonic death in mares. In: McKINNON, A. L., VOSS, J. L. **Equine Reproduction.** 2 ed. Lea and Febiger. Philadelphia, c. 61, p. 517-531, 1993.

BANDO, J. K., COLONNA, M. Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 17, n. 7, p. 783-789, 2016.

BATUT, I., COLCHEN, S., FIENI, F., TAINTURIER, D., BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Vet J.** v. 29, s.25, p. 60-62, 1997.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 691-702, 2000.

BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D., SCHUMACHER, J., LOVE, C. C., BRINSKO, S. P., RIGBY, S. L. **Manual of equine reproduction**. Ed. Fathman EN. Mosby. 2 ed. St. Louis, 2003.

BRAY, M. A., GORDON, D., MORLEY, J. Proceedings: Role of prostaglandins in reactions of cellular immunity. **British journal of pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 453, 1974.

BRUNCKHORST, D., SCHOON, H. A., BADER, H., SIEME, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische charakteristika des endometrialen zyklus bei der stute. **Fertilität**. v. 7, p. 44-51, 1991.

CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 580-588, 2005.

CROSSETT, B., ALLEN, W. R., STEWART, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. **Biochen J** v. 320, p. 137-143, 1996.

GASTAL, M. O., GASTAL, E. L., KOT, K., GINTHER, O. J. Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology**. 46; 1171-1180, 1996.

GERSTENBERG, C., ALLEN, W. R., STEWART, F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. **J Reprod Fertil** n. 116, p.167-175, 1999.

GEBHART, S. MERKL, M., HERBACH, N., WANKE, R., HANDLER, J., BAUERSACHS, S. Exploration of Global Gene Expression Changes During the Estrous Cycle in Equine Endometrium **Biology of Reproduction**. 87(6):136, 1–13, 2012.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, p. 603–611, 1983.

GINTHER, O. J. **Equiservices**. 2 ed. Winsconsin, 1992.

FIALA, S. M., PIMENTEL, C. A., MATTOS, A. L. G., GREGORY, R. M., MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 556-562, 2007.

FLOOD, P. F., JONG, A., BETTERIDGE, K. J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **J Reprod Fertil**. v. 57, p. 291-294, 1979.

JOHANNISSON, E., NELSON, L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. **Fertil Steril**. n. 23, 1972.

KALPOKAS, I., PERDIGÓN, F., RIVERO, R., TALMON, M., SARTORE, I., VIÑOLES, C. Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. **Acta Vet Scand**, v. 16, p. 52:66, 2010.

KANAGAWA, H., HAFEZ, E. S. E., PITCHFORD, W. C., BAECHLER, C. A., BARNHART, M. I. Surface patterns in the reproductive tracts of the rabbit observed by scanning electron microscopy. **Anat Rec**. v. 174, p. 205–226, 1972.

KEENAN, L. R., FORDE, D., MCGREAD, T., WADE, J., ROCHE, J.F. Endometrial histology of early pregnant and non-pregnant mares. **J Reprod Fertil Suppl**. 35; 499-504, 1987.

KEENAN, L.R., FORDE, D., MCGREADY, T., QUINN, P.J., ROCHE, J.F. Ultrastructure of the endometrium of mares in anoestrus, oestrus, dioestrus and early pregnancy. **J Reprod Fertil Suppl** 44; 695-96, 1991.

KENNEY, R. M., Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. **J Am Vet Med Ass**. v. 17(23), p. 241- 262, 1978.

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

KLEIN, C., TROEDSSON, M. H., Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, p.952–963, 2011b.

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

KOTILAINEN, T., HUHTINEN, M., KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**. v. 41, p. 629–636, 1994.

LEFRANC, A. C., ALLEN, W. R. Endometrial gland surface density and hypoaemia of the endometrium during early pregnancy in the mare. **Equine Vet J**. v. 39, p. 511-515, 2007.

MANSOUR, G. D., FERREIRA, A. M., FERNANDES, F. T., HENRY, M. Histomorphometry of epithelial structures of the mares endometrium. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 11, n. 1/2, p. 44-48, jan./ago. 2004.

MARTÍNEZ PEREIRA-MACHADO, M. N. et al (2016). Preñez temprana en la yegua: cambios histomorfológicos e inflamatorios endometriales y de hormonas circulantes desde la ovulación hasta los 13 días. **Dissertação de Mestrado**. Univeridad de la República, Uruguay.

MATTOS, R. C., FIALA-RECHSTEINER, S. M., MARTÍNEZ, M. N., CAMOZZATO, G. C., DE SOUZA, A. M., WINTER, G. H. Z. O endométrio no transporte espermático e durante a gestação precoce. **R. Bras. Reprod. Anim.**, v. 39, n. 1, p. 111-116, 2015.

MCCUE, P. M., SQUIRES, E. L. **Equine embryo transfer**. CRC Press, 2015.

MCDOWELL, K. J., SHARP, D. C. Maternal Recognition of Pregnancy. In: MCKINNON, A.O. et al. **Equine Reproduction**. 2 ed. Blackwell publishing ltd. Iowa, v. 2, c. 227, p. 2200-2210, 2011

MEIRA, C., FERREIRA, J. C., Silva, E. S. M., IGNÁCIO, F. S. Developmental aspects of early pregnancy in mares. **Anim Reprod**. v.9, n.3, p.166-172, 2012.

MERKL, M., ULBRICH, S. E., OTZDORFF, C., HERBACH, N., WANKE, R., WOLF, E., HANDLER, J., BAUERSACHS, S. Microarray analysis of equine endometrium at Days 8 and 12 of pregnancy. **Biol Reprod**, v. 83, p. 874–886, 2010.

MERKL, M. C. Microarray Analysis of the Equine Endometrium at Days 8 and 12 of Pregnancy. Dissertação Inaugural para obter doutorado em veterinária da Faculdade de Veterinária de Ludwig-Maximilians-University de Munich, 2011.

PIERDOMINICI, M., et al. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. **Immunology letters**, v. 132, n. 1, p. 79-85, 2010.

RAILA, G., AUPPERLE, H., SCHOON, H. A., MENGER, S., SCHOON, D., MÜLLING, C., SIENE, H., KLUG, E. Endometrosis in the mare: immunohistological and ultrastructural investigations. **Reprod Domest Anim Suppl**, n. 5, p.115, 1998.

RAMBAGS, B., VAN TOL, H., VAN DEN ENG, M., COLENBRANDER, B., STOUT, T. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. **Theriogenology**. v. 69, p. 366–375, 2008.

RICKETTS SW. **Histological and histopathological studies on the endometrium of the mare**. Fellowship thesis, London: Royal College of Veterinary Surgeons, 1978.

SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Elsevier Health Sciences, 2009.

SAMUEL, C. A., RICKETTS, S. W., ROSSDALE, P. D., STEVEN, D.H., THURLEY, K. W. Scanning electron microscope studies of the endometrium of the cyclic mare. **J Reprod Fert Suppl.**, v. 27, p. 287–292, 1979.

SANFILIPPO, J. S., BARROWS, G. H., APHARIAN, R. P., WITTLIFF, J. L. Evaluation of damazol influence upon the uterus using scanning electron microscope morphometric and biochemical analysis. **Surg Gynecol Obstet**. v. 16, p. 421–428, 1985.

SCHLAFER, D. H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v. 68 (3) p. 413-422, 2007.

SHORT, R. V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In 'Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy'. (Eds G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor.) p. 2–26, 1969.

SILVA, L. A., GASTAL, E. L., BEG, M. A., GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biol Reprod.**, v. 72; p. 755-61, 2005.

SILVA, L. A., GINTHER, O. J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biol Reprod.** v. 74; p. 337-43, 2006.

SNIJDEWINT, F. G., et al. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 12, p. 5321-5329, 1993.

STOUT, T. A., ALLEN, W. R. Oestrogens and pregnancy maintenance in the mare: for or against? **Pferdeheilkunde**, v. 17, p. 579–582, 2001.

STOUT, T.A. The early pregnancy; In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Elsevier Health Sciences, c. 19, p. 223, 2009.

SZÓSTEK, A., GALVÃO, A. M., HOJO, T., OKUDA, K., SKARZYKNSI, D. J. Interleukins Affect Equine Endometrial Cell Function: Modulatory Action of Ovarian Steroids. **Mediators of Inflammation** . v. 2014, Article ID 208103, 11 p. 2014.

TROEDSSON, M. H. T., LOSET, K., ALGHAMDI, A. M., DAHMS, B., CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal reproduction science**, v. 68, n. 3, p. 273-278, 2001.

VAN NIEKERK, C. H., GERNEKE, W. H. Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. *J. Vet. Res.* v.33, p.195-232, 1966.

WEBER, J. A., FREEMAN, D. A., VANDERWALL, D. K., WOODS, G. L. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 4, p. 540-543, 1991.

WEBER, J. A., FREEMAN, D. A., VANDERWALL, D. K., WOODS, G. L. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biol Reprod.**, v. 45, p. 544-546, 1991.

WEBER, J. A., WOODS, G. L., FREENAN, D. A., VANDERWALL, D. K. Prostaglandin E2-specific binding to the equine oviduct. **Prostaglandins**. v. 43, p. 61- 65, 1992.

WEBER, J. A., WOODS, G. L., LICHTENWALNER, A. B. Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 125-130, 1995.

WINTER, G.H. (2014). Arquitetura e Estrutura Endometrial Eqüina entre o 21º e 42º días de Gestação. **Tesse de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

ZAVY, M. T., MAYER, R., VERNON, M. W., BAZER, F. W., SHARP, D. C. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. **J Reprod Fertil Suppl**, v.27, p. 403-411, 1979.