

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**ARQUITETURA E ESTRUTURA ENDOMETRIAL EQUINA ENTRE O 21º E  
42º DIAS DE GESTAÇÃO**

Doutorado

Gustavo Henrique Zimmermann Winter

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**ARQUITETURA E ESTRUTURA ENDOMETRIAL EQUINA ENTRE O 21º E  
42º DIAS DE GESTAÇÃO**

Autor: Gustavo Henrique Zimmermann Winter

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

Porto Alegre, abril de 2014.

### CIP - Catalogação na Publicação

Winter, Gustavo Henrique Zimmermann  
Arquitetura e estrutura endometrial equina entre  
o 21° e 42° dias de gestação / Gustavo Henrique  
Zimmermann Winter. -- 2014.  
100 f.

Orientador: Rodrigo Costa Mattos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto  
Alegre, BR-RS, 2014.

1. célula ciliada. 2. uNK. 3. embrião. 4.  
reconhecimento materno da gestação. 5. glândula  
endometrial. I. Mattos, Rodrigo Costa, orient.  
II. Título.

**GUSTAVO HENRIQUE ZIMMERMANN WINTER**

**ARQUITETURA E ESTRUTURA ENDOMETRIAL EQUINA ENTRE O 21º E  
42º DIAS DE GESTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

**APROVADO POR:**

---

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos - UFRGS

Orientador

---

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva - USP

Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino - USP

Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner - UFPEL

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiríssimo lugar às duas principais pessoas da minha vida, e que formam a minha família: minha amada Andreza e nosso filho Benjamin. Vocês são a razão disto tudo, vocês são meus “mais que tudo”! Amo demais vocês. Andreza, sempre no incentivo e com muita paixão pelo tema das placentas.

Ben, é tudo para ti. Sorte & sucesso, meu filho!!!

Agradeço também aos meus pais, Vera e Nelson, e meus irmãos.

Um “*muchas gracias*” ao amigo Nicolas, “nosso cara” no Uruguai.

Ao professor Rodrigo Costa Mattos, pelos ensinamentos e sabedoria e pelas oportunidades nestes quatro anos de doutorado no REPROLAB. Rodrigo, foi na terceira arrancada, mas agora acertamos o pulo.

Meus agradecimentos são singelos, mas são de coração.

***“Teaching consists of causing or allowing people to  
get into situations from which they cannot escape  
except by thinking.”***

***Juan C. Samper***

## RESUMO

### **Arquitetura e estrutura endometrial equina entre o 21º e 42º dias de gestação**

Autor: Gustavo Henrique Zimmermann Winter

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

O embrião equino apresenta um desenvolvimento dinâmico por um longo período entre a fertilização, sua entrada no útero, fixação e posterior invasão trofoblástica após o 36º dia da gestação. Durante todo este período o concepto é sustentado pelo histotrofo endometrial. Estas características dos equídeos favorecem o seu uso com modelo experimental in vivo para estudos nos desenvolvimentos e interações fetal e maternal. Os estudos em endométrio equino tiveram foco em eventos fisiológicos nas diferentes fases do ciclo estral, enquanto os estudos aos primeiros momentos da gestação são escassos. O entendimento do processo de remodelação e morfofisiologia do endométrio após a entrada do embrião no útero não é completamente entendido. O objetivo deste trabalho foi estudar a morfofisiologia endometrial da gestação na égua envolvendo os períodos pós-fixação e peri-implantação, por histologia e microscopia eletrônica de varredura. A característica mais marcante da transformação ou adaptação endometrial à gestação foi o quase total desaparecimento das células ciliadas na superfície epitelial em ambos cornos uterinos. A capacidade de secreção das células microvilosas também passou por mudanças com o avanço gestacional. Muitas células secretórias ingurgitadas e protusas formam a maioria da população do epitélio, onde o histotrofo se acumula, e apresentaram erosões em sua superfície,

provavelmente pela secreção apócrina de vesículas. A superfície epitelial apresentou pleomorfismo celular e pseudoestratificação, promovida por intensa hiperplasia celular, acompanhada de adensamento das glândulas endometriais, desde o 21º dia da gestação diminuído após o 36º dia. Linfócitos, provavelmente uNK, foram encontrados no epitélio luminal do endométrio já aos 21 dias de gestação em ambos cornos, gravídico e não gravídico. Foi evidenciado o septamento no epitélio luminal, com sulcos formados aos 35 e 36 dias, tornando-se mais profundos aos 42 dias de gestação. Toda esta evolução e adaptação contínua aconteceram principalmente no corno gravídico acompanhados em menor intensidade pelo corno não gravídico.

**Palavras-chave.** Célula ciliada, uNK, embrião, reconhecimento materno da gestação, glândula endometrial.



## **ABSTRACT**

### **Architecture and structure of equine endometrium between 21<sup>st</sup> and 42<sup>nd</sup> days of pregnancy**

Author: Gustavo Henrique Zimmermann Winter

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

The equine embryo plays a dynamic development for a long period between fertilization, its entry into the uterus, fixation and subsequent trophoblastic invasion after day 36 of gestation. Throughout this period, the conceptus is supported by endometrial histotrophs. These equine characteristics favor their use as an in vivo experimental model for studying the changes and interactions in fetal and maternal development. Studies in equine endometrium were focused on physiological events in the different phases of the estrous cycle, while studies in early moments of pregnancy are scant. The process of endometrial remodeling and morphophysiology after the maternal recognition of pregnancy is not completely understood. The objective of this work was to study the endometrial morphophysiology in the mare comprising post-fixation and peri-implantation periods, by histology and scanning electron microscopy. The most striking feature of endometrial transformation or adaptation to pregnancy was the almost total ciliated cells disappearance of the epithelial surface in both uterine horns. In addition, the secretory capacity of microvillus cells underwent changes with gestational age. Many engorged and protruded secretory cells were the majority epithelium population where histotroph accumulates, and showed

erosions on its surface, probably by apocrine vesicle secretion. The epithelial surface also showed cellular pleomorphic and pseudostratified epithelium as a result of intense cell hyperplasia. It was accompanied by thickening of the endometrial glands from day 21 of gestation, then decreasing after the 36<sup>th</sup> day. Lymphocytes, probably uNK, were found in the luminal epithelium of the endometrium since 21<sup>st</sup> day of gestation in both pregnant and not pregnant horns. Septation was evidenced in the luminal epithelium, with sulci formed at 35 days, becoming deeper at 42 days of pregnancy. All this continued evolution and adaptation occurred mainly in the gravid horn accompanied in less intensity by non-gravid horn.

**Key words.** Ciliated cell, uNK, embryo, maternal recognition of pregnancy, endometrial glands.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Eletromicrografias exemplificando os tipos celulares que compõem a superfície do epitélio endometrial: célula ciliada (A), células secretórias microvilosas de superfícies planas (B) ou protusas (C). ..... 46

FIGURA 2. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 21 dias de gestação. (A) Epitélio luminal pseudoestratificado e pleomórfico, presença de vacúolos de migração transepitelial, glândulas com epitélio colunar alto e muito conteúdo vesicular dando aspecto floculado/esponjoso (PAS 400x, barra = 50µm); (B) epitélio luminal variando de simples à pseudoestratificado com pleomorfismo celular, glândulas com epitélio colunar alto e muito conteúdo vesicular dando aspecto floculado/esponjoso (HE 200x, barra = 100µm). (C) Eletromicrografia (1000x) evidenciando reduzido número de células ciliadas, células secretórias ativas e bastante ingurgitadas principalmente nos bordos e calhas, histotrofo acumulado; (D) eletromicrografia (500x) mostra células secretórias ativas e ingurgitadas nas calhas, histotrofo disseminado; células ciliadas ausente nos cumes do endométrio. .... 50

FIGURA 3. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 24-25 dias de gestação. (A) Epitélio luminal e glandular com células secretórias ativas e ingurgitadas, grande proporção de células ciliadas nos ductos células do epitélio luminal cuboide e núcleo em posição mediana, membrana basal fina, vacúolos com linfócitos intraepiteliais podem ser observados entre as células do epitélio luminal e ductos (PAS – 400x, barra = 50µm). (B) Aparente distanciamento e afrouxamento do EC (PAS – 100x, barra = 200µm). (C) EE com hiperplasia celular das glândulas na porção média e basal. Epitélio colunar alto, citoplasma com alguns vacúolos secretórios na porção apical da célula. Núcleo oval posicionado na porção basal da célula. Células ciliadas podem ser vistas na luz das glândulas abaixo da imagem. MEC com aparente edema (PAS – 400x, barra = 50µm). (D) Hiperplasia celular do epitélio luminal e glândulas. Os núcleos em hiperplasia estão mais irregulares no formato. Pleomorfismo e zonas de pseudoestratificação do epitélio luminal. À esquerda uma glândula dilatada apresentando hiperplasia celular e núcleos regulares/homogêneos. Vacúolos de linfócitos intraepiteliais são esporadicamente encontrados (HE – 400x, barra = 50µm). ..... 52

FIGURA 4. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 30 dias de gestação. (A) Epitélio luminal e glandular com células secretórias ativas, pseudoestratificado e pleomórfico (PAS – 400x, barra = 50µm). (B) Pleomorfismo celular do epitélio luminal e do ducto da glândula. Regiões de pseudoestratificação do epitélio luminal intercalado com zonas de epitélio mais cúbico e aparente abundância de vascularização (HE – 1000x, barra = 15µm). (C) Eletromicrografia (750x) apresenta células ciliadas em pouca quantidade e apenas nos sulcos por entre o abundante histotrofo, células secretórias de superfície plana nos topos das dobras e protusas principalmente localizadas nos sulcos. As células ao redor das aberturas de glândulas continuavam geralmente ingurgitadas. (D) Eletromicrografia (1000x) mostra histotrofo disseminado pela superfície, nas zonas de cume praticamente só haviam células microvilosas de superfície planas e bocas de glândulas rodeadas de células mais convexas. As células secretórias protusas se alojavam principalmente nas regiões mais fundas das calhas. .... 54

FIGURA 5. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 35 dias de gestação. (A) Epitélio luminal colunar alto, núcleos na porção média da célula com citoplasma abundante e vacúolos no terço basal. Grande presença de linfócitos no epitélio luminal, no estroma do EC e no epitélio de alguns ductos. As células da MEC no EC tem núcleo alongado, e muitos vasos capilares intimamente relacionado à membrana basal, um vaso linfático é encontrado no EC. Epitélio glandular hiperplásico, com núcleos bem assentados na porção basal da célula e grande quantidade de citoplasma que toma forma espumosa na porção apical da célula (PAS – 400x, barra = 50µm). (B) Epitélio luminal colunar médio à alto, núcleos posicionados na porção média da célula com vacúolos no terço basal. Algumas porções pseudoestratificadas e pleomórficas, presença de linfócitos intraepiteliais. EC aparentemente frouxo, permitindo a formação de sulcos (PAS – 400x, barra = 50µm). (C) Eletromicrografia (1500x) apresentando histotrofo acumulado nas calhas e vesículas secretórias aparentes nas bocas de glândulas. Raras células ciliadas foram encontradas nas bordas e calhas das dobras endometriais, onde as células microvilosas, de superfície mais plana e de borda poligonal apresentavam erosões de membrana. (D) Eletromicrografia (1000x) mostrando maiores sulcos e menor quantidade de histotrofo e bolhas secretadas em relação ao corno gravídico. Erosões de membrana plasmática presentes nas células secretoras de superfícies planas ou convexas sendo a maioria nos cumes bastante planos, e células secretórias ingurgitadas presente apenas nos bordos da calhas. .... 57

FIGURA 6. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 42 dias de gestação. (A) Epitélio luminal colunar simples, de média altura, praticamente em toda sua extensão e poucas zonas com pleomorfismo

celular e grupos de células nos topos em secreção apócrina ativa. O núcleo está posicionado no terço mediano da célula epitelial e vacúolos secretórios podem ser encontrados apical e basalmente. Alguns vacúolos de migração linfocitária estão presentes pelo epitélio luminal. Há pleomorfismo celular no epitélio glandular e nos ductos. O epitélio da glândula é colunar alto, organizado, com núcleo ovalado posicionado na porção basal da célula (PAS – 400x, barra = 50µm). (B) Os sulcos estão evidenciados na superfície endometrial, cujo epitélio apresenta regiões de pseudoestratificação, pleomorfismo e vacúolos de migração transepitelial. O EC é menos denso e contém leucócitos mononucleares difusos (PAS – 400x, barra = 50µm). (C) Eletromicrografia (1000x) do endométrio do corno grávidico apresentando sulcos mais profundos ou septamento materno e cumes das dobras planos. Uma série de células secretórias apócrinas ativas, aparentando material recém secretado e outras já erodidas estão presentes nos cumes, e o histotrofo presente nas calhas. (D) Eletromicrografia (1000x) do corno não grávidico com sulcos profundos aonde as células secretórias estão bastante protuberantes. Nos topos a maioria das superfícies das células está plana ou levemente convexa, geralmente erodidas, com algum histotrofo e eventuais células ciliadas presentes. .... 60

FIGURA 7. Fotomicrografias do corno grávidico de endométrio ao 21º (A), 30º (B), 35º (C) e 42º (D) dias de gestação mostrando a evolução temporal e adaptação endometrial à presença da vesícula embrionária. HE (A) e PAS (B, C e D) 100x, barra = 200µm. .... 62

FIGURA 8. Fotomicrografias do corno não grávidico de endométrio ao 21º (A), 30º (B), 35º (C) e 42º (D) dias de gestação, mostrando a adaptação temporal da superfície endometrial. HE (A, C e D) e PAS (B) 100x, barra = 200µm. .... 64

Figura suplementar 1. Fotomicrografia do endométrio equino ao diestro (HE – 200x, barra = 100µm). Epitélio luminal simples colunar baixo, núcleos posicionados na base da célula. Estrato compacto relativamente denso e curto. O epitélio glandular é colunar médio apresenta células ciliadas nos ductos (círculos). Hiperplasia celular glandular também está presente em diferentes zonas do estrato esponjoso (elipses). ..... 75

Figura suplementar 2. Eletromicrografia do endométrio equino ao diestro mostrando grande população de células ciliadas difusas e disseminadas entre as células microvilosas secretórias. As secretórias estão em sua maioria levemente convexas ou protusas, algumas com erosão de membrana. Bocas de glândula podem ser vistas e algum material secretório e encontrado nas calhas (MEV – 700x). .... 76

Figura suplementar 3. Fotomicrografia do endométrio equino aos 42 dias de gestação, corno grávidico (PAS – 400x, barra = 50µm). Epitélio luminal simples

colunar médio e zonas com pleomorfismo celular (círculos). Vacúolos de migração transepitelial são encontrados, bem como linfócitos no estrato compacto (setas). O epitélio glandular apresenta células ciliadas nos ramos das glândulas e principalmente nos ductos (cabeça de seta). Hiperplasia celular glandular também está presente. O epitélio luminal ainda apresenta células rompidas ou erodidas, algumas com protusão do núcleo e conteúdo citoplasmático (quadrados), semelhante ao encontrado na MEV em Figura Suplementar 4. .... 77

Figura suplementar 4. Eletromicrografia do endométrio equino aos 42 dias de gestação, corno gravídico. Cume do endométrio onde se visualizam células secretórias microvilosas. Muitas apresentam erosão da membrana plasmática em diferentes graus de lesão após secreção apócrina. O histotrofo está presente e se acumula nas calhas (MEV – 5.000x). .... 78

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Desenvolvimento das características observadas por MEV e histologia ao diestro e entre os 21 <sup>o</sup> , 24-25 <sup>o</sup> , 30 <sup>o</sup> , 35-36 <sup>o</sup> e 42 <sup>o</sup> dias de gestação em endométrio equino. ....	65
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 A chegada do embrião ao útero .....	18
2.2 A cápsula do embrião .....	19
2.3 Ambiente uterino e interação com o embrião .....	20
2.4 Migração e fixação do embrião .....	21
2.5 Invasão trofoblástica, cálices endometriais e placentação .....	23
2.6 Nutrição do concepto .....	25
2.7 As glândulas endometriais .....	26
2.8 Interação embrionária – endometrial .....	28
2.9 A ultraestrutura da conexão fetomaternal .....	30
2.10 Estrutura histológica do endométrio .....	32
2.11 Perda embrionária precoce .....	35
2.12 Microscopia óptica, eletrônica de varredura e de transmissão ....	37
<b>3. ARTIGO</b> .....	38
<b>4. FIGURAS SUPLEMENTARES</b> .....	75
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	79
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>ANEXO A. Artigo Publicado</b> .....	92



## 1. INTRODUÇÃO

A preparação e a adaptação endometrial são eventos importantes para o sucesso da implantação do embrião no útero nos mamíferos. Os equinos possuem características únicas durante a gestação, espécie específica, que os diferem da gestação de outros mamíferos.

Entre as espécies de grandes animais domésticos, o conceito equino é provavelmente o mais lento na realização da implantação e do desenvolvimento de uma placenta estável para sustentar o crescimento intrauterino até o parto. Além disso, os embriões em equinos parecem ter de informar a sua mãe, não uma, mas duas vezes a sua presença no útero. Primeiramente, ao sinalizar e inibir a luteólise e, segundo, ao promover a invasão de suas células do anel coriônico ao endométrio (ALLEN & WILSHER, 2009). Estes eventos durante um longo período tornam o equino um excelente modelo experimental para estudo da gestação.

A vesícula embrionária deixa o oviduto e entra no útero por volta do 6º dia após a fertilização sendo detectável por ultrassonografia tão cedo quanto no 9º dia (BETTERIDGE et al., 1982; GINTHER, 1995). O conceito é livre até o dia 15 após a fertilização quando se fixa na base de um dos cornos uterinos por conta da contratilidade uterina (GINTHER, 1983; GASTAL et al., 1996). Durante esta fase de mobilidade uterina o embrião percorre todo lúmen uterino ao mesmo tempo que apresenta uma taxa de crescimento (diâmetro) de cerca de três milímetros ao dia (GINTHER, 1983). Durante todo este período de mobilidade, a vesícula embrionária é revestida por uma cápsula glicoproteica acelular, que persiste até os 21 dias de gestação (BETTERIDGE, 1989).

Após este período de mobilidade, a vesícula embrionária permanece fixa, mas não implantada ao endométrio. Somente por volta do 36º dia da gestação é que as células trofoblásticas do anel coriônico embrionário penetram ativamente no endométrio. E por volta do 40º dia tem-se a placentação, através do desenvolvimento corioalantóide e início da formação dos microcotilédones (SAMUEL et al., 1974). As células trofoblásticas invasivas dos equinos não têm homólogos conhecidos em outras espécies com placentação epiteliocorial. Após a invasão, migração e rápida diferenciação estas células permanecem firmemente alojadas no estroma endometrial. Formam-se então os cálices endometriais, de origem fetal, responsáveis pela secreção do hormônio gonadotrofina coriônica equina (eCG). Os cálices endometriais persistem desde o 40º até o dia 150 da gestação que tem duração aproximada de 330 dias (GINTHER, 1992; ALLEN & WILSHER, 2009). Ainda assim, permanecem lacunas sobre o entendimento do processo de remodelação e morfofisiologia do endométrio após a entrada do embrião no útero, reconhecimento materno da gestação, o período de migração embrionária na luz uterina e seus períodos de fixação e posterior implantação.

Durante o longo período entre a concepção e implantação do embrião no útero a égua está sujeita à interrupção da gestação, principalmente pela perda embrionária precoce, acarretando transtornos reprodutivos e consideráveis perdas econômicas na indústria equina. A perda embrionária precoce entre os dias 12 e 40 da gestação pode ocorrer em até 10% a 30% das éguas jovens e idosas, respectivamente (GINTHER, 1992; VANDERWALL & NEWCOMBE, 2007). As interações embrionárias com o epitélio endometrial antes e após sua fixação podem fornecer subsídios que ajudem a esclarecer eventos importantes que levem a perda gestacional.

O objetivo deste estudo foi descrever as mudanças morfofisiológicas endometriais promovidas durante a gestação inicial, especialmente nos períodos pós fixação e peri-implantação do concepto equino.

## **2. Revisão bibliográfica**

Durante o início da gestação o ambiente uterino está física e bioquimicamente dinâmico. As interações materno-embrionárias são vitais durante este período para, além de evitar a luteólise, auxiliar na fixação e nidadação do concepto. A presença de um endométrio sadio e funcional é essencial durante a gestação na égua, principalmente durante a implantação e durante o período anterior a este evento, quando o concepto livre é sustentado inteiramente pelas secreções exócrinas das glândulas endometriais (LEFRANC & ALLEN, 2007b).

### **2.1 A chegada do embrião ao útero**

A égua começa a preparar-se para uma eventual gestação em cada fase lútea, independentemente de ter sido acasalada ou não (SHARP, 2000). Porém, quando um embrião está presente no útero, a luteólise deve ser bloqueada para que o corpo lúteo continue a secretar o hormônio progesterona (GINTHER, 1992). A progesterona é essencial para proporcionar o ambiente uterino apropriado, vital para o desenvolvimento inicial do concepto (KASTELIC et al., 1987). Éguas ovariectomizadas se tornam aptas à gestação simplesmente administrando a progesterona (HINRICHS & KENNEY, 1987). Já a remoção de progesterona circulante em éguas no início da gestação, por

ablação cirúrgica do corpo lúteo ou por administração de prostaglandina F<sub>2a</sub> (PGF<sub>2α</sub>) leva à perda embrionária precoce (GINTHER, 1985).

Ainda no estágio de mórula, a partir do 4<sup>o</sup> dia, o embrião equino produz prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) provocando um relaxamento da camada muscular circular e contraindo a camada longitudinal do oviduto (WEBBER et al., 1995). O embrião é propelido pela constrição istmo-ampola e entra no lúmen uterino através da papila útero-tubária entre o 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dia pós fertilização (WEBBER et al., 1991).

## **2.2 A cápsula do embrião**

Em torno do 6<sup>o</sup> dia e até por volta dos dias 21 a 22 pós fertilização o embrião apresenta uma característica única dos equinos, uma cápsula embrionária persistente no blastocisto (BETTERIDGE et al., 1982, BETTERIDGE, 2000). Entre o sexto e o sétimo dia a zona pelúcida se desfaz, assim como em outras espécies, e desenvolve-se uma cápsula glicoproteica. Esta cápsula tem considerável importância funcional entre os dias 7 e 21 aproximadamente, mantendo o formato esférico do conceito, e proporcionando a resistência para permitir que o embrião se movimente por todo o útero e suporte a considerável força do miométrio neste período (ALLEN & WILSHER, 2009).

A cápsula é composta por uma glicoproteína tipo mucina produzida em grande parte pelo trofoblasto embrionário. A dissolução desta cápsula acelular inicia-se em torno do 21<sup>o</sup> dia da gestação com perda dos ácidos siálicos presentes na cápsula (BETTERIDGE et al., 1982; ENDERS & LIU, 1991a; BETTERIDGE, 2000). O conceito encapsulado interage com o seu ambiente durante duas fases distintas, é extremamente móvel até os 16 a 17 dias e, em seguida, torna-se imobilizado ou fixo no local da eventual placentação. A

cápsula, ao mesmo tempo que proporciona proteção física ao embrião, provavelmente afeta o modo como o embrião e o endométrio interagem (BETTERIDGE, 2000; RUJITER-VILLANI et al., 2013).

### **2.3 Ambiente uterino e interação com o embrião**

O concepto equino desempenha um papel no controle do seu próprio ambiente intrauterino sinalizando sua presença, garantindo o reconhecimento materno da gestação, e contribuindo diretamente para o ambiente de esteroides da luz uterina. Diversas substâncias são encontradas neste ambiente uterino, produzidas e metabolizadas pelo endométrio, embrião, ou ambos. Entre elas os eicosanoides (prostaglandinas), hormônios esteroides, proteínas e peptídeos (BETTERIDGE, 2000).

De modo geral, a receptividade uterina à implantação do blastocisto inclui: 1) eclosão da zona pelúcida; 2) pré-contato com o lúmen uterino; 3) aposição entre trofotoderma e epitélio uterino; 4) adesão do trofotoderma ao epitélio uterino e 5) dependendo da espécie, invasão endometrial. Estes eventos pré-implantação são requisitos para a posterior placentação e desenvolvimento da unidade feto-placentária durante a gestação. Produtos secretórios do epitélio uterino (histotrofo), adequada sinalização entre o concepto e o epitélio uterino e transferência de gases e nutrientes são fatores críticos para o reconhecimento da gestação, implantação, placentação, crescimento e desenvolvimento do feto (BAZER et al., 2009).

A preparação e a adaptação endometrial são eventos importantes para o sucesso da implantação do embrião no útero nos mamíferos. Um dos eventos que ocorrem neste período é o aparecimento dos pinópodes na superfície do epitélio endometrial das mulheres (NIKAS, 1999; NIKAS & AGHAJANOVA, 2002). Os pinópodes são identificados por microscopia

eletrônica de varredura (MEV) como formações especializadas das células epiteliais do endométrio durante a fase secretória (lútea), aproximadamente sete dias após a ovulação. Os microvilos da célula secretória se fundem transitoriamente em uma única projeção na membrana, tem aspecto de flor ou globo (“*single flower-like*”) com 6µm de diâmetro e desaparecem de dois (NIKAS & AGHAJANOVA, 2002) à cinco dias (QUINN & CASPER, 2009). Embora a transformação seja evidente e precisa, a completa função dos pinópodes ainda é desconhecida o que gera debate sobre a sua real importância e utilidade como um marcador para a receptividade endometrial na mulher (NIKAS, 1999; NIKAS & AGHAJANOVA, 2002; QUINN & CASPER, 2009). Por outro lado, o exame do tecido endometrial durante o primeiro trimestre da gravidez em mulheres revelou uma abundância de pinópodes, sugerindo que eles também podem persistir após a fase lútea normal (QUINN et al., 2007). E ainda, conforme a revisão escrita por Quinn & Casper (2009) os pinópodes, ou estruturas similares aos pinópodes, são identificados durante a gestação inicial em alguns animais de produção como em bovinos, ovinos e suínos, e mesmo em camelos, coelhos e macacos. No entanto, não há descrição da ocorrência de estruturas similares aos pinópodes em endométrios equinos.

#### **2.4 Migração e fixação do embrião**

A vesícula embrionária migra continuamente ao longo de todo útero desde sua entrada ao lúmen uterino, e é altamente móvel entre os dias 11 e 15 (GINTHER, 1983) provavelmente para sinalizar a sua presença de modo uniforme e reunir as secreções uterinas a partir de todo o útero (SHARP, 2000). A restrição da mobilidade embrionária para uma pequena zona uterina não permite a prevenção da luteólise (MCDOWELL et al., 1988). Esta migração se dá por movimentos peristálticos do endométrio, estimulados através da

contínua liberação de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> pelo embrião (STOUT & ALLEN, 2002). A mobilidade começa a diminuir no dia 15, e após o 17º dia a migração cessa. A fixação é definida como o cessar da mobilidade embrionária (GINTHER, 1983) e pelo encontro do sítio de implantação.

O útero equino é flácido durante e imediatamente após o estro. Por ação da progesterona aumenta de tônus durante o diestro, diminui levemente o tônus até o dia 10 ou 11, e depois, se a égua está gestante, aumenta gradualmente de contratilidade e se torna túrgido. O aumento do tônus uterino está associado a uma diminuição do diâmetro do útero e continua até os dias 25-30 da gestação. Este aumento gradual do tônus e diminuição do diâmetro uterino aparentemente se combinam para resultar na fixação da vesícula embrionária ao 17º dia pós fertilização, mantendo-a na base de um dos dois cornos uterinos (GASTAL et al., 1996). E neste local a vesícula embrionária permanece fixa, não implantada, pelos próximos 25 dias (GINTHER 1992, 1998).

Uma série de mudanças morfológicas dos componentes e membranas embrionárias, bem como o desenvolvimento do embrião propriamente dito, tem sequência. Todo este desenvolvimento é sustentado através do consumo, pelas células trofoblásticas, das secreções exócrinas endometriais, o histotrofo (ALLEN & WILSHER, 2009). Durante este período o alantocórion em desenvolvimento e expansão não promove nenhuma tentativa de estabelecer uma implantação mais estável no endométrio materno e iniciar o processo de placentação (WILSHER & ALLEN, 2012).

Embora seja bem aceito que existe a fixação mas não implantação da vesícula embrionária (GINTHER, 1983) até a formação dos cálices endometriais (ANTCZAK et al., 2013) uma breve nota relatada por Silva et al. (2011) descreve uma interessante observação. Durante a dissecação uterina para estudo *in situ* da morfologia embrionária e endometrial foram notadas algumas pequenas aderências do embrião aos 21 dias de idade com a porção dorsal do endométrio. Pareciam haver várias pequenas áreas granulares de contato entre a superfície do saco vitelino, acima do sinus terminalis, com o

endométrio (SILVA et al., 2011). Estas estruturas foram descritas por Ewart em 1915 como sendo discos trofoblásticos (BETTERIDGE et al., 2005). Estes discos estão sobre a superfície exterior e aposto aos tubérculos vitelínicos que projetam cordas translúcidas na face interna da parede do saco vitelino bilaminar. Estas estruturas, no entanto, tem sido pouco estudadas e são uma peculiaridade da vesícula embrionária equina que talvez mereça uma maior atenção (BETTERIDGE et al., 2005; BETTERIDGE, 2007).

## **2.5 Invasão trofoblástica, cálices endometriais e placentação**

Somente por volta do 36º dia da gestação é que as células trofoblásticas do anel coriônico da vesícula embrionária penetram ativamente no endométrio (ENDERS & LIU, 1991a, 1991b). As células trofoblásticas invasivas dos equinos não têm homólogos conhecidos em outras espécies com placentação epiteliocorial. Após a maturação, invasão, migração, rápida diferenciação, estas células binucleadas permanecem firmemente alojadas no estroma endometrial. Formam-se então os cálices endometriais, de origem fetal, responsáveis pela secreção do hormônio gonadotrofina coriônica equina (eCG) (ALLEN & MOOR, 1972; ALLEN et al., 1973; ANTCZAK et al., 2013).

O processo de invasão dos trofoblastos destrói localmente o epitélio superficial do endométrio. O epitélio se regenera rapidamente abrangendo o aspecto luminal dos cálices por volta do dia 45, mantendo-os completamente isolados da placenta. Os cálices endometriais são, deste modo, aloenxertos fetais individuais (ALLEN & MOOR, 1972; ALLEN et al., 1973; LUNN et al., 1997; GINTHER, 1998). Com a invasão de células do anel coriônico para o endométrio estas células trofoblásticas se tornam foco de acúmulo de linfócitos maternos (ENDERS & LIU, 1991a, 1991b), especialmente linfócitos T tipos CD4+, CD8+ e CD3+ (GRÜNIG et al., 1995; NORONHA et al., 2012)



caracterizados como células exterminadoras naturais (NK, *natural killer cells*). Primeiramente estes linfócitos permanecem agrupados no estroma endometrial na periferia do cálice, e só se direcionam ao interior da estrutura do cálice por volta do dia 60 a 70 de gestação (ENDERS & LIU, 1991b; ENDERS et al, 1991; LUNN et al., 1997).

Em diversas espécies, as células NK do útero e decídua são distintas da população periférica em termos de fenótipo e função (CROY et al., 2006). Suas funções na gestação não estão completamente elucidadas, mas tem sido implicadas na remodelação vascular e facilitação da invasão trofoblástica (TABIASCO et al., 2006; HARRIS, 2011). Em equinos durante a gestação, as primeiras evidências da expressão de marcadores para células NK no endométrio foram relatadas recentemente (NORONHA et al., 2012). Estes autores sugerem que estas células NK uterinas (uNK) no equino atuem para facilitar a invasão trofoblástica e remodelação endometrial, em função semelhante à descrita para espécies de placentação hemocorial e que sofrem alterações nas artérias espiraladas no útero.

Os cálices endometriais persistem aproximadamente desde o 40<sup>o</sup> até o dia 150 da gestação que dura aproximados 330 dias na égua. A porção basal das glândulas endometriais justapostas aos cálices fica distendida com acumulado exócrino de secreções devido à ablação das saídas das glândulas (ANTCZAK et al., 2013).

A placentação propriamente dita só inicia a partir do 40<sup>o</sup> dia da gestação (SAMUEL et al., 1974, 1975), cerca de 5 dias após o processo de invasão das células especializadas do anel coriônico ao endométrio. A placenta é a unidade morfofuncional para promoção das trocas de nutrientes e de gases entre a circulação materna e fetal durante toda a gestação. A placenta alantocoriônica dos equídeos é classificada como epiteliocorial microcotiledonária difusa, não invasiva, e não decídua. A unidade de troca placentária nos equídeos é denominada de microcotilédone. Este termo tem sido utilizado para abranger tanto o tecido fetal quanto o materno (GINTHER, 1992). A placentação equina demanda interdigitações feto-maternais por toda a

superfície do endométrio para otimizar o desenvolvimento do feto *in utero* (WILSHER & ALLEN, 2004).

## 2.6 Nutrição do concepto

Entre os mamíferos duas vias principais evoluíram para transferir nutrientes da mãe para o feto, denominadas histotrófica e hemotrófica, respectivamente. Histotrofo é um material extracelular derivado do endométrio e das glândulas uterinas que se acumula no lúmen uterino no espaço entre os tecidos fetal e maternal. Este histotrofo contém as proteínas de transporte uterocalina e a uteroglobulina entre outros constituintes que são a principal fonte de nutrientes para o concepto, que está em rápida expansão durante seus primeiros 40 dias de vida (ALLEN & WILSHER, 2009). O histotrofo é fagocitado inicialmente pelo trofotoderma do blastocisto, e depois pelo trofoblasto da placenta ou da endoderme e mesoderme do saco vitelino. Por outro lado, nutrição hemotrófica é a troca de materiais transmitidos pelo sangue entre as circulações materna e fetal. Isto é facilitado pela aposição extensa e íntima dos tecidos maternos e fetais que ocorre na placentação. Antes da implantação, a nutrição do concepto de mamíferos é, portanto, essencialmente histotrófica. Uma vez que a placenta é estabelecida, a nutrição hemotrófica torna-se predominante, embora as duas vias possam coexistir por muito mais tempo na gestação em certas espécies (BURTON et al., 2002).

As secreções uterinas produzidas pelo endométrio são essenciais para o concepto além de também participarem de outras funções e eventos reprodutivos. Destes, auxiliam nas seguintes funções: 1) capacitar o espermatozoide; 2) providenciar um sistema de trocas metabólicas e de nutrientes e a excreção de produtos entre a vesícula embrionária e o endométrio; 3) manter um ambiente físico-químico propício; 4) cumprir os

requerimentos imunológicos e antibacterianos; 5) providenciar a lubrificação para a mobilidade e, mais tarde, na fixação, adesão e orientação do embrião (GINTHER, 1992). O endométrio equino é capaz de fornecer constituintes ao histotrofo por secreção merócrina das glândulas endometriais e por secreção apócrina das células do epitélio superficial (KEENAN et al., 1991). A secreção é merócrina quando o material é secretado por exocitose para o lúmen ou ducto glandular. A secreção apócrina ocorre com a formação de vesículas e desprendimento da superfície celular, com perda de citoplasma, diretamente para o lúmen uterino, e é mais danosa à célula que a secreção merócrina.

## **2.7 As glândulas endometriais**

Existem diferenças histológicas sutis entre o endométrio em diestro ou gestante logo após a ovulação (KEENAN et al., 1987). Alguns estudos estimaram as densidades das glândulas endometriais adaptando métodos estereológicos (LEFRANC & ALLEN, 2007b) ou pela contagem total das estruturas visualizadas à histologia (SILVA et al., 2011) em locais e dias definidos do início da gestação em equinos. Lefranc & Allen (2007a) mostraram um aumento significativo na densidade e superfície glandular endometrial em éguas cíclicas no decorrer do diestro. Maior e mais extensa ramificação e enrolamento das glândulas ocorreram sob a influência contínua de progesterona lútea. Durante o início da gestação equina, como sequência do diestro, ocorre um aumento na densidade de glândulas do endométrio (LEFRANC & ALLEN, 2007b).

O exame por microscopia eletrônica de transmissão (MET) comparou a ultraestrutura de células das glândulas endometriais em éguas gestantes aos 26 dias comparadas com éguas de mesma idade gestacional que sofreram ruptura proposital da vesícula embrionária oito dias antes, promovendo um

diestro prolongado. Os autores demonstraram que estas células glandulares em éguas gestantes têm maior quantidade de vacúolos secretórios do que nas éguas em diestro prolongado (LEFRANC et al., 2014). Estes dados também corroboram a ideia de que o próprio embrião é responsável por seu desenvolvimento, promovendo mudanças na morfofisiologia endometrial através de fatores embrionários próprios.

Com o avanço da gestação há um aparente, porém não significativo, aumento da densidade das glândulas endometriais até o 21º (SILVA et al., 2011) ou 30º dia (LEFRANC & ALLEN, 2007b). Ao comparar o endométrio do corno gravídico com o não gravídico, dos 12 aos 30 dias de gestação, igualmente não foram notadas diferenças significativas para a densidade glandular (LEFRANC & ALLEN, 2007b). Os autores concluem que seria interessante determinar se o desenvolvimento, a ramificação e envelamentos das glândulas, continua com o avanço da gestação. Em especial no 40º ou 42º dias e posteriormente, quando a placentação tem início e os microvilos do corioalantóide se aderem ao endométrio.

Como descrição histológica da unidade embrio-materna, do endométrio gravídico, Allen & Wilsher (2009) relatam brevemente que o endométrio se mantém engrossado na região em contato com a vesícula embrionária até o dia 30 da gestação. As glândulas endometriais apresentam ramos fortemente enrolados que penetram o estroma até uma boa profundidade. Estas são revestidas por células epiteliais colunares com coloração escura, núcleos na base e um citoplasma floculado. Ao mesmo tempo, entre os dias 20 e 30 de gestação, o córion fetal é composto de células trofoblásticas epitelióides, colunares baixas, com citoplasma pálido e núcleo na porção basal. Esta fina membrana continua justaposta, mas não fisicamente aderida, ao epitélio luminal do endométrio materno (ALLEN & WILSHER, 2009).

## 2.8 Interação embrionária-endometrial

O desenvolvimento vascular e a remodelação tecidual em ambos os compartimentos fetal e maternal, são essenciais durante a gestação nos mamíferos. Antes da implantação, o endométrio providencia o histotrofo para suporte, sobrevivência e desenvolvimento do embrião, mas o crescimento fetal aumenta a demanda por trocas gasosas e de nutrientes (hemotrofo) até o completo desenvolvimento placentário (BURTON et al., 2002; WILSHER & ALLEN, 2012). A adaptação vascular uterina à crescente necessidade nutricional do concepto ocorre através de vasodilatação e do crescimento e desenvolvimento de novos vasos. A angiogênese, que é o processo da formação de vasos sanguíneos em resposta direta à demanda tecidual, desempenha importante papel no trato reprodutivo nas mudanças associadas à gestação (ZIGMUNT et al., 2003).

As mudanças morfológicas e vasculares das glândulas endometriais em torno do concepto equino sugerem o envolvimento de fatores embrionários agindo de maneira bastante localizada. Uma quantidade considerável de histotrofo de boa qualidade é necessária durante o período de pré-implantação do embrião. O aumento na produção histotrófica está provavelmente relacionado ao incremento da densidade glandular do epitélio materno (LEFRANC & ALLEN, 2007a; WILSHER & ALLEN, 2012). Há também, o aumento da vascularização uterina com elevado fluxo sanguíneo no local de contato embrio-maternal, que aumenta o aporte de nutrientes para o concepto e permite o acesso à produtos endometriais induzidos pela vesícula embrionária na circulação materna (WILSHER & ALLEN, 2012).

O embrião, ou vesícula embrionária, intermedeia a remodelação do tecido endometrial e o desenvolvimento vascular no endométrio (SILVA et al., 2011), a formação de cálices endometriais (ANTCZAK et al., 2013) e a inter-relação de uma série de fatores de crescimento e fatores mitogênicos (LENNARD et al., 1998; ALLEN et al., 2007). A expressão dos fatores de

crescimento epidérmico (EGF) e transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ) aumenta dramaticamente no epitélio da glândula endometrial entre os dias 30 e 40 da gestação, correlacionando-se com o início da invasão das células trofoblásticas embrionárias (LENNARD et al., 1995; LENNARD et al., 1998).

A biossíntese de estrógenos por embriões pré-implantação tem sido documentada em espécies com placentação epiteliocorial como na égua e na porca. O embrião equino desde os 12 dias de idade secreta estradiol (E<sub>2</sub>) e estrona (E<sub>1</sub>) em quantidades importantes (RAESIDE et al., 2004). Além disto, o embrião propriamente dito é capaz de metabolizar o estrógeno que se encontra no saco vitelínico – uma função de significado em potencial neste estágio de desenvolvimento (RAESIDE et al., 2009). Estes pesquisadores sugerem a necessidade de considerar o papel do metabolismo do estrógeno local, dentro dos tecidos reprodutivos e nos tecidos formados pelo concepto nesta fase inicial da gestação, o que inclui os eventos críticos de expansão do concepto e fixação ao endométrio.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um mitógeno de células endoteliais e fator de permeabilidade vascular, atua como um intermediário em uma variedade de tecidos estrógeno responsivos. A imunolocalização para VEGF e receptores VEGFR1 (ou Flt-1) e VEGFR2 (ou KDR) foi demonstrado (ALLEN et al., 2007; SILVA et al., 2011). Sugere-se haver uma especificidade para o VEGFR2 no epitélio luminal e glandular, endotélio vascular e em algumas células do estroma endometrial de éguas no início da gestação (SILVA et al., 2011).

O VEGF é expresso em glândula endometrial e epitélio luminal por todo o período relativo ao desenvolvimento do anel coriônico (ALLEN et al., 2007). Já o fator de crescimento de hepatócitos (HGF-SF, *Hepatocyte growth factor - scatter factor*) é expresso exclusivamente pelos mesênquima alantóide e células mesoteliais embrionárias justapostas ao córion e anel coriônico (STEWART et al., 1995; GERSTENBERG et al., 1999) atuando como o estímulo mitogênico para a própria proliferação do trofoblasto. As células trofoblásticas invasoras maduras expressam os receptores de EGF, FGF, HGF,

VEGF e Flt-1 e KDR, o que indica que as células são capazes de responder a esses sinais (LENNARD et al., 1998; ALLEN et al., 2007).

## **2.9 A ultraestrutura da conexão fetomaternal**

A conexão fetomaternal é um fenômeno que envolve muitos aspectos, onde os tecidos e compartimentos fetal e maternal estão em estreita associação durante a gestação. Esta associação depende principalmente de (1) adesão, a qual pode ser determinada por estudos de ultra-histoquímica (ultraestrutura e imunohistoquímica) e de biologia molecular, e (2) sobre a forma como os tecidos corioalantóide e endometrial se ligam. O estudo morfológico da aposição fetomaternal entre tecidos corioalantóides e endometriais pode ser caracterizada por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (SAMUEL et al., 1976; ENDERS & LIU, 1991a; LEISER et al., 1998).

Diversos estudos morfológicos e morfométricos da placenta equina em idades avançadas da gestação foram conduzidos para descrever o desenvolvimento dos microcotilédones. As avaliações mostram detalhes da formação e progressão microcotiledonária da membrana coriônica com o avanço da gestação através das técnicas de MET e de MEV (SAMUEL et al., 1974, 1975, 1976, 1977; STEVEN et al., 1979; MACDONALD et al., 2000). Diversos destes estudos concordam que a formação completa da placenta ocorre próximos dos dias 120 e 150 da gestação, mas pode haver um contínuo crescimento de ramos dos microcotilédones também na segunda metade da gestação (MACDONALD et al., 2000).

No entanto, os estudos focados na ultraestrutura do endométrio são mais escassos. Até pouco tempo, os estudos com MEV em endométrio equino praticamente se resumiam aos de Samuel et al. (1979) com foco em eventos

fisiológicos nas diferentes fases do ciclo estral; seguido por Keenan et al. (1991) que também relatou as fases do ciclo estral e ao início da gestação. Já a publicação de Al-Bagdadi et al. (2004) relata as alterações morfológicas causadas no epitélio endometrial após a infusão do antibiótico gentamicina. E, mais recentemente, Souza et al. (2014) descreveram a estrutura de superfície endometrial do corno gravídico, por MEV, em éguas durante a evolução da primeira metade da gestação.

Neste estudo de 1979, Samuel et al. descreveram as características da superfície endometrial durante o ciclo estral. O epitélio é composto de três tipos principais de células, que variam de acordo com o estágio do ciclo: células microvilosas secretórias, células ciliadas e células prociliadas.

As células secretórias providas de microvilos foram as mais abundantes por todo ciclo estral. Eram claramente demarcadas e de contorno superficial poligonal. As células ciliadas tinham contornos arredondados. Os cílios, que cobriam toda superfície da célula, tinham entre 6 e 10µm de comprimento e eram claramente separados entre si. As células prociliadas apresentavam projeções mais curtas, presumidamente identificadas como cílios em início de desenvolvimento. As células secretórias poligonais podiam apresentar bolhas de secreção apical na membrana plasmática.

As aberturas das glândulas endometriais podem ser vistas dispersas pela superfície como profundas depressões, geralmente circundadas por anéis de células ciliadas. As pregas endometriais são separadas primariamente por longos sulcos profundos, e saliências menores com calhas secundárias estão presentes ao longo destas pregas primárias.

Durante o estro a maioria das células eram poligonais microvilosas, e células ciliadas e prociliadas estavam distribuídas por toda área. As bolhas apicais de secreção estavam pedunculadas e aparentemente brotando para o lúmen uterino, em provável secreção apócrina.

Durante o diestro, as células secretórias ativas declinam em número mas continuam sendo as fundamentais no epitélio, algumas secretando outras



mais planas evidenciando os microvilos. As células ciliadas atingem densidade máxima na metade deste período passando a diminuir até o final do diestro. Apesar desta diminuição, a quantidade de células ciliadas sempre foi maior que durante o estro. As células prociliadas só foram identificadas ao início do diestro (SAMUEL et al., 1979).

Na avaliação da ultraestrutura por MET, o endométrio em estro foi caracterizado por hipertrofia e diferenciação das células secretórias, com intensa vacuolização celular, aumento do número de ribossomos, e retículo endoplasmático granular proeminente. Já ao diestro havia hipertrofia do complexo de Golgi, numerosos vacúolos secretórios e retículo endoplasmático granular proeminente, indicando síntese proteica ativa (KEENAN et al., 1991).

## **2.10 Estrutura histológica do endométrio**

A avaliação da saúde uterina de éguas por biópsia endometrial e histopatologia tem sido um procedimento padrão em reprodução equina há mais de 35 anos. A fisiologia e principalmente a patologia do endométrio equino no que diz respeito ao prognóstico de fertilidade tem sido bastante estudados através das biópsias endometriais. Nas últimas duas décadas, foram desenvolvidas novas técnicas de diagnóstico, mas a histopatologia baseada em hematoxilina e eosina continua a ser o principal método de avaliação endometrial (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978; DOIG et al., 1981; KENNEY & DOIG, 1986; DOIG & WAELCHI, 1993; BAE & WATSON, 2003; SCHOON & SCHOON, 2003; AMARAL et al., 2004; MANSOUR et al., 2004; SCHLAFER, 2007; HOFFMANN et al., 2009; LEHMANN et al., 2011; BARROS & MASUDA, 2009, 2013).

O útero equino é composto de três camadas. A camada interna é a mucosa, ou endométrio, que não é decídua. A segunda camada, intermediária,

é o miométrio com fibras circulares internamente e longitudinais externamente. O perimétrio é a terceira e mais externa camada uterina. Uma biópsia endometrial geralmente consiste exclusivamente 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 consiste de células cuboides a colunares altas que residem na membrana basal, variando de 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 um milímetro 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 conferindo-lhe um aspecto esponjoso. Normalmente este espaço fica preenchido de fluído tissular. Os vasos no EE são capilares, arteríolas, vênulas e ocasionalmente pequenas artérias musculares. Também estão presentes no EE os vasos linfáticos (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978).

A característica marcante da lâmina própria é a presença de numerosas glândulas uterinas. Estas glândulas são originadas e conectadas ao epitélio luminal por ductos. Os ductos estão localizados integralmente no EC e são usualmente simples, sem ramificações. 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. A presença de vacúolo citoplasmático é comum neste período, especialmente no terço basal da célula. Edema, congestão vascular e infiltrado leucocitário são comuns neste período (RICKETTS, 1978). Como resultado do edema endometrial a densidade glandular por unidade de área é menor no estro do que em outras fases. As glândulas são menos tortuosas que durante o diestro (KENNEY, 1978).

Na fase de diestro o epitélio luminal é colunar baixo. A densidade glandular normalmente aumenta durante o diestro; o edema do estroma está diminuído ou ausente 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 e podem 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). Diferente das éguas, as mulheres tem o útero com endométrio decidual e sabidamente a hiperplasia glandular, resultado de atividade mitótica, é um evento fisiológico e necessário durante a fase proliferativa do ciclo menstrual. A fase proliferativa é estrógeno dependente e durante este período as glândulas do endométrio após a descamação endometrial (regressão do tecido e apoptose celular) são repostas a partir das glândulas basais remanescentes (DALLENBACH-HELLWEG et al., 2010). Ainda, durante a fase proliferativa, a incidência de células ciliadas no endométrio humano é diretamente dependente e controlada pelos níveis de estrógeno (MORE & MASTERSON, 1976) durante o ciclo menstrual normal ou em situações patológicas.

Durante a gestação inicial em equinos, Keenan et al. (1987) relatam eventos comuns aos encontrados durante o diestro. A presença de epitélio

cuboidal e colunar simples ou pseudoestratificado, vacúolos celulares, presença de leucócitos no estroma, adensamento de glândulas, foram descritos em diestro e períodos gestacionais distintos até 21 dias. Mas o pleomorfismo celular do epitélio superficial foi relatado apenas nas éguas gestantes.

## **2.11 Perda embrionária precoce**

Durante o longo período entre a concepção e implantação do embrião ao útero a égua está sujeita à interrupção da gestação, principalmente pela perda embrionária precoce, o que determina transtornos reprodutivos e consideráveis perdas econômicas (VANDERWALL & NEWCOMBE, 2007). A perda embrionária ocorre antes dos 40 dias de gestação, enquanto a organogênese está incompleta (RODRIGUES et al., 2014). A morte fetal precoce ocorre antes dos 150 dias da gestação, e a morte fetal tardia acontece depois deste período (PYCOCK, 2009). Durante estas trocas de períodos, importantes eventos acontecem na gestação. Por volta do 36º e 40º dias tem-se o estabelecimento dos cálices endometriais e início da placentação (ANTZACK et al., 2013; SAMUEL et al., 1974, 1975). A produção de P4 ainda é realizada pelos corpos lúteos acessórios nos ovários. Somente por volta dos 100 dias de gestação é que tem início a produção de progesterógenos pela placenta (GINTHER, 1992). Estes períodos de transição nutricional e de produção e secreção hormonal podem ser críticos para eventuais falhas gestacionais.

A taxa de fertilização é de 90% ou mais em éguas férteis, o que é comparável à outras espécies domésticas. Estima-se que a taxa de perda embrionária precoce em éguas férteis seja de 5 a 24%, enquanto em éguas subférteis esta taxa é maior (PYCOCK, 2009). A perda embrionária precoce

entre os dias 12 e 40 da gestação pode ocorrer em até 10% a 30% das éguas jovens e idosas, respectivamente (GINTHER, 1992). O período de maior perda embrionária em éguas subférteis ocorre no intervalo anterior ao momento em que se possa realizar o diagnóstico gestacional por ultrassonografia (dia 11), particularmente no período que o embrião entra no útero (PYCOCK, 2009).

A perda embrionária precoce é multifatorial. Fatores externos (extrínsecos) bem como patofisiológicos (intrínsecos e embrionários) estão envolvidos. Fatores intrínsecos maternos que podem promover a morte embrionária incluem deficiência e desequilíbrio hormonal, ambiente uterino desfavorável, idade e lactação. Um ambiente uterino inadequado é detrimental ao embrião. A endometrite pode induzir a luteólise e provocar a perda embrionária, ou mesmo ter um efeito direto sobre o embrião no ambiente uterino desfavorável. De fato, éguas com histórico de endometrite tem maior taxa de perda embrionária compradas com éguas em este histórico (VANDERWALL, 2008). Já éguas que apresentam endometrose ou mudanças degenerativas no endométrio relacionado à idade, como a angiose e lacunas linfáticas, podem afetar a qualidade do ambiente uterino (PYCOCK 2009; WILSHER & ALLEN, 2012).

Ainda, alguns fatores embrionários podem acarretar a morte do embrião. Estes fatores podem ser inerentes ao embrião como os defeitos cromossômicos ou da qualidade do oócito em éguas idosas. Por outro lado, algumas biotécnicas da reprodução, como a transferência de embrião e a manipulação de gametas para fertilização in vitro, estão associados à maiores taxas de perda embrionária precoce (VANDERWALL & NEWCOMBE, 2007).

## **2.12 Microscopia óptica, eletrônica de varredura e de transmissão**

A microscopia óptica de luz geralmente fornece magnificação de 40 X até 1.000 X, é amplamente acessível e de fácil manuseio. Dependendo do equipamento é possível atingir a magnificação de até 1.600 X ou 2.000 X instalando um conjunto de oculares mais potentes. Por outro lado, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode fornecer uma magnificação na ordem de milhares de vezes (até 300.000 X). Já os equipamentos de microscopia eletrônica de transmissão (MET), com cortes semifinos das amostras, podem alcançar facilmente a faixa de magnificação de até 500.000 X, ou em alguns equipamentos, chegar de 2.000 X até incríveis 1,2 milhão de vezes de magnificação. Porém, o uso de microscópios eletrônicos requer maior conhecimento técnico operacional e tratamento bastante específico das amostras. Uma preparação de amostra para histologia em microscopia de luz mede cerca de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de espessura, ao passo que um corte semifino para uso em MET tem desde 0,01  $\mu\text{m}$  (o mesmo que 10 nanômetros) a até 1  $\mu\text{m}$  de espessura (fonte: Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, disponível em [www.ufrgs.br/cme/infraestrutura.html](http://www.ufrgs.br/cme/infraestrutura.html)).

### 3. ARTIGO

#### **Arquitetura e estrutura endometrial equina entre o 21º e 42º dias de gestação**

Gustavo Henrique Zimmermann Winter<sup>1</sup>, Andreza Morais de Souza<sup>1</sup>, Nicolas Cazales<sup>1,2</sup>, Rodrigo C Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> REPROLAB – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Facultad de Veterinaria – UDELAR, Montevideo, Uruguay

#### **Resumo**

O embrião equino apresenta um desenvolvimento dinâmico por um longo período entre a fertilização, sua entrada no útero, fixação e posterior invasão trofoblástica após o 36º dia da gestação. Durante todo este período o concepto é sustentado pelo histotrofo endometrial. Estas características dos equídeos favorecem o seu uso com modelo experimental in vivo para estudos nos desenvolvimentos e interações fetal e maternal. Os estudos em endométrio equino tiveram foco em eventos fisiológicos nas diferentes fases do ciclo estral, enquanto os estudos aos primeiros momentos da gestação são escassos. O entendimento do processo de remodelação e morfofisiologia do endométrio após a entrada do embrião no útero não é completamente entendido. O objetivo deste trabalho foi estudar a morfofisiologia endometrial da gestação na égua envolvendo os períodos pós-fixação e peri-implantação, por histologia e microscopia eletrônica de varredura. A característica mais marcante da transformação ou adaptação endometrial à gestação foi o quase total desaparecimento das células ciliadas na superfície epitelial em ambos cornos uterinos. A capacidade de secreção das células microvilosas também passou

por mudanças com o avanço gestacional. Muitas células secretórias ingurgitadas e protusas formam a maioria da população do epitélio, onde o histotrofo se acumula, e apresentaram erosões em sua superfície, provavelmente pela secreção apócrina de vesículas. A superfície epitelial apresentou pleomorfismo celular e pseudoestratificação, promovida por intensa hiperplasia celular, acompanhada de adensamento das glândulas endometriais, desde o 21<sup>o</sup> dia da gestação diminuído após o 36<sup>o</sup> dia. Linfócitos, provavelmente uNK, foram encontrados no epitélio luminal do endométrio já aos 21 dias de gestação em ambos cornos, gravídico e não gravídico. Foi evidenciado o septamento no epitélio luminal, com sulcos formados aos 35 e 36 dias, tornando-se mais profundos aos 42 dias de gestação. Toda esta evolução e adaptação contínua aconteceram principalmente no corno gravídico acompanhados em menor intensidade pelo corno não gravídico.

**Palavras-chave.** Célula ciliada, uNK, embrião, reconhecimento materno da gestação, glândula endometrial.

### **Architecture and structure of equine endometrium between 21<sup>st</sup> and 42<sup>nd</sup> days of pregnancy**

#### **Abstract**

The equine embryo undergoes to a dynamic development for a long period throughout fertilization, its entry into the uterus, fixes and subsequent trophoblastic invasion after day 36 of gestation. Throughout this period, the conceptus is supported by endometrial histotrophe. These equids characteristics favor their use as an in vivo experimental model for studying the changes and interactions in fetal and maternal development. Studies in equine



endometrium were focused on physiological events in the different phases of the estrous cycle, while studies in early moments of pregnancy are scant. The process of endometrial remodeling and morphophysiology after the maternal recognition of pregnancy is not completely understood. The objective of this work was to study the endometrial morphophysiology in the mare comprising post-fixation and peri-implantation periods, by histology and scanning electron microscopy. The most striking feature of endometrial transformation or adaptation to pregnancy was the almost total ciliated cells disappearance of the epithelial surface in both uterine horns. In addition, the secretory capacity of microvillus cells underwent changes with gestational age. Many engorged and protruded secretory cells were the majority epithelium population where histotroph accumulates, and showed erosions on its surface, probably by apocrine vesicle secretion. The epithelial surface also showed cellular pleomorphic and pseudostratified epithelium as a result of intense cell hyperplasia. It was accompanied by thickening of the endometrial glands from day 21 of gestation, then decreasing after the 36<sup>th</sup> day. Lymphocytes, probably uNK cells, were found in the luminal epithelium of the endometrium since 21<sup>st</sup> day of gestation in both pregnant and not pregnant horns. Septation was evidenced in the luminal epithelium, with sulci formed at 35 days, becoming deeper at 42 days of pregnancy. All this continued evolution and adaptation occurred mainly in the gravid horn accompanied in less intensity by non-gravid horn.

**Key words.** Ciliated cell, uNK, embryo, maternal recognition of pregnancy, endometrial glands.

## INTRODUÇÃO

A égua se preparara para uma eventual gestação em cada fase lútea, independentemente de ter sido acasalada ou não (SHARP, 2000). A preparação ou a adaptação endometrial são eventos importantes para o sucesso da implantação do embrião no útero nos mamíferos. Assim como em outras espécies, o reconhecimento materno da gestação (SHORT, 1969) previne a luteólise resultando na manutenção do corpo lúteo e produção de progesterona (GINTHER, 1992) para sustentar o embrião e a gestação inicial (KASTELIC et al., 1987). O concepto equino é capaz de produzir quantidades importantes de hormônios esteroides, notavelmente estrógenos, que podem de alguma maneira auxiliar no processo de reconhecimento e manutenção inicial da gestação (RAESIDE & CHRISTIE, 2008). Do mesmo modo, o concepto segue desempenhando um papel ativo ao intermediar a remodelação do tecido endometrial e o desenvolvimento vascular no endométrio (SILVA et al., 2011), a formação de cálices endometriais (ANTCZAK et al., 2013) e a inter-relação de uma série de fatores de crescimento e mitogênicos (LENNARD et al., 1998; WALTERS et al., 2001; ALLEN et al., 2007) durante a gestação.

A vesícula embrionária entra no útero por volta do 6º dia após a fertilização e é detectável por ultrassonografia tão cedo quanto o dia 9 (BETTERIDGE et al., 1982; GINTHER, 1995). O concepto é livre até o 15º ao 17º dia pós fertilização quando se fixa na base de um dos cornos uterinos (GINTHER, 1983; GASTAL et al., 1996). Somente por volta do 36º dia da gestação é que as células trofoblásticas do anel coriônico da vesícula embrionária penetram ativamente no endométrio (ALLEN & MOOR, 1972; ALLEN et al., 1973) promovendo o início da implantação embrionária propriamente dita. A partir deste momento tem-se a formação dos cálices endometriais, que persistem aproximadamente desde o 40º até o 150º dia da gestação (ANTCZAK et al., 2013). A ligação da placenta ao útero, a placentação propriamente dita, é um processo gradual de desenvolvimento nos complexos microcotilédones ou microcarúnculas entre os dias 40 e 150 da

gestação (SAMUEL et al., 1975; GINTHER, 1992). Estes eventos acontecem por um longo período, o que torna o equino um excelente modelo experimental para estudos a gestação inicial.

Os estudos focados na ultraestrutura do endométrio são mais escassos. Até pouco tempo, os estudos com MEV em endométrio equino praticamente se resumiam aos de Samuel et al. (1979) com foco em eventos fisiológicos nas diferentes fases do ciclo estral; seguido por Keenan et al. (1991) que também relatou as fases do ciclo estral e aos primeiros momentos da gestação. Já a publicação de Al-Bagdadi et al. (2004) versa sobre alterações morfológicas causadas no epitélio endometrial após a infusão do antibiótico gentamicina. E, mais recentemente, Souza et al. (2014) descreveram a estrutura de superfície endometrial do corno gravídico, por MEV, em éguas durante a evolução da primeira metade da gestação.

Por outro lado, a avaliação da saúde uterina de éguas por histopatologia tem sido um procedimento padrão em reprodução equina há mais de 35 anos. A fisiologia e principalmente a patologia do endométrio equino no que diz respeito ao diagnóstico e prognóstico de fertilidade tem sido bastante estudados através das biópsias endometriais. Nas últimas duas décadas, foram desenvolvidas novas técnicas de diagnóstico, mas a histopatologia baseada em hematoxilina e eosina (HE) continua a ser o principal método de avaliação endometrial (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978; DOIG et al., 1981; KENNEY & DOIG, 1986; DOIG & WAELCHI, 1993; BAE & WATSON, 2003; SCHOON & SCHOON, 2003; AMARAL et al., 2004; MANSOUR et al., 2004; SCHLAFER, 2007; HOFFMANN et al., 2009; LEHMANN et al., 2011; BARROS & MASUDA, 2009, 2013).

O desenvolvimento embrionário é bastante dinâmico (VAN NIEKERK & ALLEN, 1975; BETTERIDGE et al., 1982), e pode ser acompanhado por ultrassonografia transretal (GINTHER, 1995) desde o 9º dia pós fecundação. Ao exame ultrassonográfico de uma gestação de 21 dias, na região dorsal à vesícula embrionária, o endométrio exibe um engrossamento desproporcional (*dorsal mesometrial encroachment*) comparado ao bordo ventral. Maior fluxo

sanguíneo é observado por ultrassonografia *color Doppler* nesta área de endométrio junto à área de fixação mesometrial quando comparada ao corno uterino contralateral (SILVA & GINTHER, 2006).

Ainda assim, permanecem lacunas sobre o entendimento do processo de remodelação e morfofisiologia do endométrio após a entrada do embrião no útero, ao reconhecimento materno da gestação, o período de migração embrionária na luz uterina e suas interações com o epitélio endometrial antes, durante e após sua fixação e posterior implantação (BETTERIDGE, 2007). Neste estudo descreveu-se, através de análises por histologia e microscopia eletrônica de varredura, a morfofisiologia endometrial em um período inicial da gestação na égua envolvendo os períodos pós-fixação e peri-implantação do concepto equino ao útero.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas doze éguas adultas, sem distinção por idade ou raça. Sete foram selecionadas em diferentes estágios gestacionais para coleta de amostras dos úteros, e cinco éguas não gestantes, cíclicas, foram selecionadas para biópsias endometriais. Os animais eram provenientes de abatedouro comercial, e os tratos reprodutivos completos eram retirados obedecendo às técnicas convencionais utilizadas em frigoríficos.

### **Coleta de amostras**

Para a obtenção das amostras os úteros foram recebidos instantes após o abate e identificados. Durante as coletas, nos úteros gestantes foram realizadas observações, dissecações e mensurações das membranas

embrionárias e fetais. Os períodos gestacionais foram estimados considerando as características morfológicas externas do desenvolvimento embrionário, por morfologia da vesícula embrionária e também pela mensuração da distância occípito-sacral (CR) em gestações mais avançadas (VAN NIEKERK & ALLEN, 1975; GINTHER, 1992; FRANCIOLLI et al., 2011) em torno dos 40 dias.

Do endométrio foram coletadas amostras com cerca de 0,5 a 1,0 cm<sup>2</sup> do corno gravídico (duas amostras) e do corno não gravídico (duas amostras) de cada trato reprodutivo selecionado. As amostras de corno gravídico foram retiradas em áreas justapostas à vesícula embrionária, preferencialmente na região dorsal do corno uterino, após separação manual das interfaces embrionária e materna. As vesículas embrionárias e fetais foram coletadas integralmente, acondicionadas em frascos e fixadas em solução de formol 10% tamponado, para posterior avaliação morfométrica.

Foram identificadas, selecionadas e coletadas amostras das seguintes idades gestacionais: 21 dias, 24 dias, 25 dias, 30 dias, 35 dias, 36 dias e 42 dias. Para análise, as idades estimadas que eram muito próximas, foram agrupadas formando cinco grupos: 21 dias, 24 e 25 dias, 30 dias, 35 e 36 dias, e 42 dias de gestação.

De éguas não gestantes, foram coletadas amostras em período de diestro, verificado pela presença de corpo lúteo em um dos ovários e ausência de folículo dominante. As amostras foram coletadas nas bases dos cornos uterinos (KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978) de cinco úteros diferentes. Todas as amostras foram imediatamente acondicionadas em soluções de conservação específicas para cada técnica a ser realizada e transportado para análise em laboratório.

### **Microscopia de luz**

Para análise histológica por microscopia de luz, as amostras coletadas foram seccionadas e colocadas em formol tamponado 10% para fixação e

armazenamento. Em seguida, as amostras foram processadas e emblocadas em parafina seguindo-se técnicas rotineiras de processamento de tecidos histológicos. Os blocos foram cortados em micrótomo automático (Leica, RM165) obtendo-se cortes de 5µm, os quais foram aderidos em lâminas histológicas de vidro e mantidos em estufa a 60° C. Após serem desparafinizados os cortes foram corados seguindo-se técnicas rotineiras de coloração de tecido (TOLOSA et al., 2003), usando a coloração de hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (PAS). A coloração PAS é usada principalmente para marcar as estruturas contendo uma proporção elevada de macromoléculas de carboidratos tais como glicogênio, glicoproteínas, proteoglicanos, glicolipídeos e mucinas, normalmente encontrados em tecidos conjuntivos, muco, glicocálix e lâmina basal.

Todas as lâminas foram analisadas por microscopia de luz em aumento de 40x, 100x, 200x, 400x e 1000x e as características morfológicas encontradas foto documentadas através de microscópio óptico (DM500, Leica) com câmera de captura (ICC500HD, Leica) e programa para aquisição de imagens (LAS EZ, Leica).

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Para observação da superfície endometrial foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Duas amostras para cada idade gestacional, sendo uma do corno gravídico e outra do corno não gravídico, foram processadas. Nesta técnica, após a coleta, os tecidos foram fixados com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Após a fixação, os fragmentos passaram por três lavagens com solução tampão fosfato 0,1 M por 30 minutos cada. Então, procedeu-se a desidratação contínua em concentração crescente de álcool etílico a 30%, 50%, 70%, 90% por 10 minutos cada, seguidas de acetona PA 90% por 20 minutos e 100% durante 10 e novamente por 20 minutos. Por fim as amostras foram desidratadas a seco em ponto crítico com CO<sub>2</sub> (*Critical Point Dryer* CPD030 - Balzers), e

cuidadosamente posicionadas e aderidas pela fita de carbono dupla face sobre o suporte metálico (*stub*) para realizar o revestimento (20nm) em ouro (*Sputter Coater SCD050* - Balzers). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura JSM 6060 (JEOL) ou EVO50 (Zeiss), ambos operando o feixe de elétrons em 10 kV, e as imagens salvas em arquivo TIFF (*Tagged Image File Format*).

## RESULTADOS

Tanto as amostras coradas por HE como as coradas por PAS mantiveram adequada conformação nas lâminas e ambas técnicas puderam ser aproveitadas para o estudo da arquitetura e estrutura morfofisiologia endometrial.

Pela análise de superfície epitelial através da MEV, dois tipos celulares são identificados: as células ciliadas, e as células epiteliais secretoras com microvilos, variando entre superfícies planas ou protuberantes ingurgitadas (Figura 1).

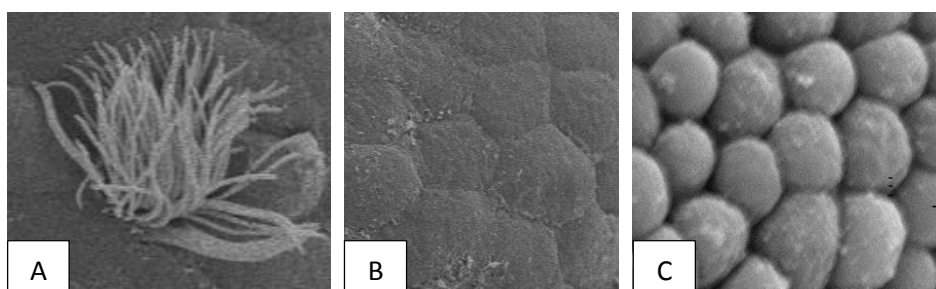


FIGURA 1. Eletromicrografias exemplificando os tipos celulares que compõem a superfície do epitélio endometrial: célula ciliada (A), células secretórias microvilosas de superfícies planas (B) ou protusas (C).

## **Diestro**

As amostras em diestro apresentaram relativo adensamento de glândulas endometriais. O estrato compacto (EC) e estrato esponjoso (EE) estavam bem demarcados, sem edema ao estroma, com EC fino, fibroblastos organizados alojando os ductos das glândulas. Epitélio luminal colunar baixo, em geral plano recebendo alguns ductos até o lúmen uterino. Células do epitélio luminal com núcleos redondos à ovalados posicionados na porção basal da célula. Epitélio glandular colunar médio à alto, com citoplasma abundante e núcleos celulares bem organizados sob a porção basal da célula. Alguns poucos focos de hiperplasia celular nos ramos basais das glândulas foram visualizados, bastante esparsos no EE (figura suplementar 1).

A imagem de microscopia por varredura das amostras durante a fase de diestro mostra o epitélio luminal e suas dobras endometriais ao longo da superfície. Cada dobra possui sulcos menores conferindo uma superfície ondulada com cumes (ou topos) e as calhas (ou sulcos). As células ciliadas estavam presentes em grande número e disseminadas homoganeamente por todo epitélio; e as células epiteliais secretoras, variando entre planas ou protuberantes ingurgitadas ocupando a maior parte da superfície (vide figura suplementar 2). Algumas células secretórias estão erodidas, provavelmente por recente secreção de vesículas. As aberturas das glândulas endometriais são facilmente identificáveis nas cristas das dobras. Pouco material histotrófico está acumulado, observado em apenas por entre as criptas.

## **21 dias de gestação**

O epitélio luminal estava pseudoestratificado colunar alto, e percebeu-se evidente pleomorfismo celular (Figura 2A). Havia secreção apócrina para o lúmen, vacúolos basais e núcleos irregulares. Algumas células ciliadas



puderam ser identificadas nas pequenas dobras da superfície ou bocas de glândulas. Algumas células menores com núcleo em hipercromasia foram identificadas entre as células do epitélio luminal, acima da membrana basal, possivelmente leucócitos mononucleares (linfócitos). Estes vacúolos celulares maiores não foram encontrados no epitélio glandular.

Observando a aparência geral da amostra do corno gravídico percebe-se adensamento e enovelamento das glândulas endometriais nas regiões média e basal. Nos ductos das glândulas foi possível identificar diversas células ciliadas. A hiperplasia celular do epitélio glandular foi marcante. A porção média das glândulas apresentava epitélio colunar alto pela quantidade de citoplasma e vacúolos apicais, que acabava diminuindo o lúmen dos ramos da glândulas que continham material secretado.

A matriz extracelular (MEC) compondo o estrato compacto (EC) apresentou edema e muitos vasos capilares localizados sob o epitélio acompanhando os cumes das dobras. A membrana basal apresentava regiões de espessamento, identificadas pela coloração de PAS. O estroma na região basal do EE apresentava-se com células mais esparsas e vasos de vários calibres. Na região basal das glândulas é marcante o pleomorfismo celular, a presença de secreção, de vacúolos basais e de núcleos irregulares. Notou-se a presença de algumas células redondas, de núcleo pequeno, com grandes vacúolos no citoplasma na base da membrana basal da glândula.

No corno não gravídico o epitélio luminal apresentou-se com regiões de maior e de menor pseudoestratificação com evidente formação de sulcos na superfície (Figura 2B). A maioria da população celular era composta de células secretórias colunares baixas à médias e algumas poucas células ciliadas estavam presentes esporadicamente. As células colunares médias apresentavam-se mais protuberantes em direção ao lúmen e muitas vezes pleomórficas, secretando ativamente. Os núcleos destas células epiteliais estavam posicionados no terço médio do citoplasma. Foi notada a presença esporádica de vacúolos de migração transepitelial no epitélio luminal e linfócitos no estroma do EC. O endométrio apresentava extensas porções de

relativo afrouxamento do EC, intercaladas com regiões de MEC mais densa. As glândulas apresentavam epitélio colunar médio a alto e bastante conteúdo citoplasmático vesicular, conferindo um aspecto floculado ou esponjoso. Hiperplasia celular nas bases das glândulas era evidente, ainda que em focos difusos pelo EE. Células ciliadas puderam ser identificadas no epitélio glandular nas regiões média e basal das glândulas, bem como nos ductos em maior quantidade. Havia histotrofo acumulado na luz glandular.

Ao exame de MEV, nas amostras do corno gravídico aos 21 dias de gestação (Figura 2C), as células ciliadas estavam geralmente localizadas nas calhas e bordas das cristas endometriais, em evidente menor concentração em relação ao diestro. A população principal era de células secretórias com microvilos, que em sua maioria estavam ingurgitadas e protuberantes, conferindo uma aparência similar ao de cacho de uvas. Havia uma população menor de células secretórias, microvilosas, de superfície de membrana ligeiramente convexas localizadas nos topos das pregas endometriais. Erosão da membrana plasmática foi encontrada principalmente em células secretórias protusas. O histotrofo estava visível, espalhado difusamente pela superfície endometrial. As células ao redor das aberturas de glândulas estavam geralmente ingurgitadas.

No corno não gravídico as dobras endometriais foram claramente identificadas e havia presença de histotrofo e vesículas secretórias difusamente espalhadas por toda amostra (Figura 2D). As células ciliadas foram vistas somente no fundo das calhas e aparentemente em menor quantidade que o corno gravídico da mesma idade gestacional. A maioria das células secretoras da superfície apresentavam aspecto convexo, com microvilos, mas não protusas e sem a aparência de cachos de uva. Algumas zonas do epitélio apresentavam células secretórias de superfície plana, e poucas estavam erodidas.

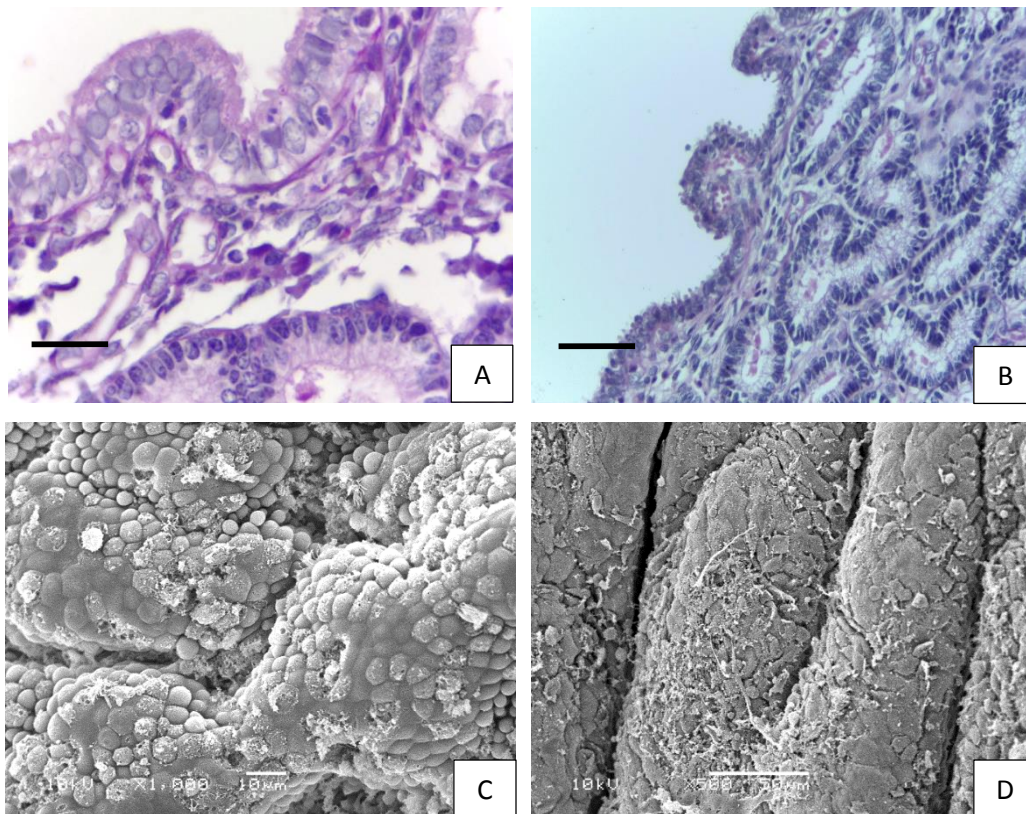


FIGURA 2. Fotomicrografias do endométrio nos cornos grávidico (A e C) e não grávidico (B e D) aos 21 dias de gestação. (A) Epitélio luminal pseudoestratificado e pleomórfico, presença de vacúolos de migração transepitelial, glândulas com epitélio colunar alto e muito conteúdo vesicular dando aspecto floculado/esponjoso (PAS 400x, barra = 50 $\mu$ m); (B) epitélio luminal variando de simples à pseudoestratificado com pleomorfismo celular, glândulas com epitélio colunar alto e muito conteúdo vesicular dando aspecto floculado/esponjoso (HE 200x, barra = 100 $\mu$ m). (C) Eletromicrografia (1000x) evidenciando reduzido número de células ciliadas, células secretórias ativas e bastante ingurgitadas principalmente nos bordos e calhas, histotrofo acumulado; (D) eletromicrografia (500x) mostra células secretórias ativas e ingurgitadas nas calhas, histotrofo disseminado; células ciliadas ausente nos cumes do endométrio.

### 24-25 dias de gestação

O epitélio luminal é simples, cuboide ou colunar baixo e tem núcleo em posição mediana, com membrana basal fina. Em algumas zonas apresentam a

formação de várias pregas de pouca profundidade. As células secretórias estão ativas e ingurgitadas. Apresentam grande proporção de células ciliadas nos ductos (Figura 3A). Observa-se, esporadicamente, a presença de células pequenas mononucleares, provavelmente leucócitos, com núcleos basófilos, entremeadas no epitélio luminal e também no glandular. Há a formação de vacúolos de migração ao redor destas células. Neste período há um aparente aumento na espessura do EC com afrouxamento da MEC e do estroma no corno grávidico. O EE tem boa profundidade e aparentou ser maior que durante o diestro.

Ainda, percebeu-se hiperplasia celular das glândulas na porção média e basal. Glândulas com epitélio colunar alto, citoplasma com alguns vacúolos secretórios na porção apical da célula. Núcleo oval posicionado na porção basal da célula. Células ciliadas foram identificadas no epitélio da glândula. Material secretado no lúmen glandular estava presente mas sem acúmulos. MEC e estroma com aparente edema disseminado pelo EE (Figura 3C).

No corno não grávidico, neste período, o epitélio luminal é simples colunar médio a alto. Os núcleos estão irregulares, localizados basalmente nas células, ocupando dois terços do citoplasma. O epitélio glandular apresenta núcleos mais basófilos (escuro) e ovalados, citoplasma com vacúolos secretórios nos ápices das células (Figura 3D). Foram identificados focos de hiperplasia celular nas glândulas, difusos no EE, com pleomorfismo e zonas de pseudoestratificação do epitélio luminal. Matriz extracelular relativamente esparsa com aparente edema no estroma. Há um aparente aumento na espessura do EC com afrouxamento da MEC. Nota-se que os ductos das glândulas estão na posição adequadas, descartando artefato durante a preparação das amostras. O comprimento relativo do extrato esponjoso é menor que o apresentado no corno grávidico da mesma idade gestacional (Figura 3B).

As amostras para MEV deste período foram danificadas no processo de metalização e serão repetidas *a posteriori*.

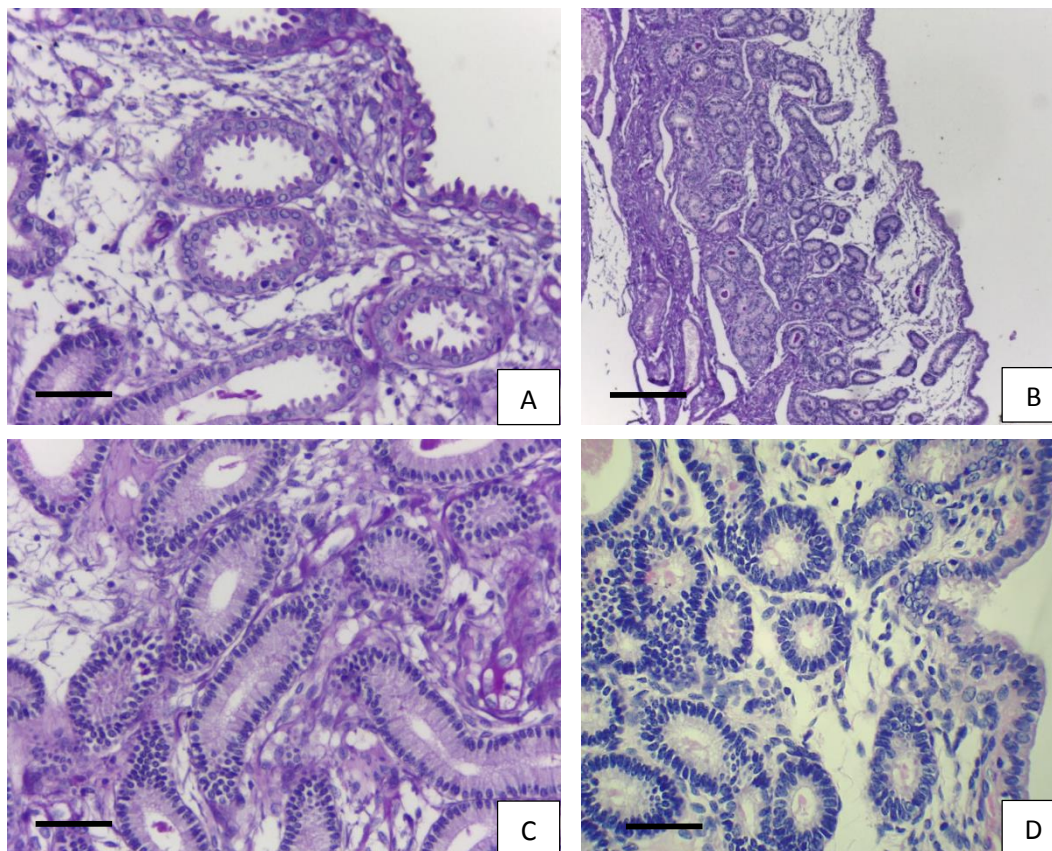


FIGURA 3. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 24-25 dias de gestação. (A) Epitélio luminal e glandular com células secretórias ativas e ingurgitadas, grande proporção de células ciliadas nos ductos células do epitélio luminal cuboídes e núcleo em posição mediana, membrana basal fina, vacúolos com linfócitos intraepiteliais podem ser observados entre as células do epitélio luminal e ductos (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). (B) Aparente distanciamento e afrouxamento do EC (PAS – 100x, barra = 200 $\mu$ m). (C) EE com hiperplasia celular das glândulas na porção média e basal. Epitélio colunar alto, citoplasma com alguns vacúolos secretórios na porção apical da célula. Núcleo oval posicionado na porção basal da célula. Células ciliadas podem ser vistas na luz das glândulas abaixo da imagem. MEC com aparente edema (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). (D) Hiperplasia celular do epitélio luminal e glândulas. Os núcleos em hiperplasia estão mais irregulares no formato. Pleomorfismo e zonas de pseudoestratificação do epitélio luminal. À esquerda uma glândula dilatada apresentando hiperplasia celular e núcleos regulares/homogêneos. Vacúolos de linfócitos intraepiteliais são esporadicamente encontrados (HE – 400x, barra = 50 $\mu$ m).



### **30 dias de gestação**

Aos 30 dias de gestação, o epitélio luminal continua apresentando pregas suaves na sua superfície, com evidente pleomorfismo celular no epitélio e também nos ductos das glândulas (Figura 4A). Regiões de pseudoestratificação do epitélio luminal colunar alto e núcleos deslocados apicalmente com acúmulo de vacúolos basais nestas células. Notou-se abundância de vascularização subepitelial, que parece acompanhar principalmente os cumes do epitélio luminal. Novamente, encontram-se linfócitos entremeados ao epitélio luminal bem como no EC abaixo da membrana basal, aparentemente em maior quantidade em relação ao período anterior. A análise das lâminas mostra um corno grávidico com relativo aumento da profundidade do EE em relação aos períodos anteriores. Uma grande densidade glandular foi notada e há relativamente um amplo espaço no EC.

No corno não grávidico, há pleomorfismo celular do epitélio luminal e do ducto da glândula e regiões de pseudoestratificação do epitélio luminal intercalado com zonas de epitélio mais cúbico (Figura 4B). Os focos de hiperplasia das glândulas endometriais são vistos com mais frequência neste período. Os grupos celulares escuros contrastam, porém, com um relativo baixo adensamento glandular. O estroma e MEC parecem frouxos tanto no EE como no EC e ocorre aparente abundância de vascularização.

As amostras analisadas por MEV de corno grávidico aos 30 dias de gestação apresentavam células ciliadas apenas nos sulcos das dobras endometriais e em pouca quantidade, em contato com o histotrofo. O histotrofo estava abundante e disseminado pelas dobras endometriais (Figura 4C). Houve um aumento na quantidade de células secretórias de superfície plana nos topos das dobras, e algumas delas apresentavam erosão da membrana plasmática. As células secretórias protusas estavam principalmente localizadas

nos sulcos onde inúmeras gotas de vesículas secretadas foram visualizadas. As células ao redor das aberturas de glândulas continuavam geralmente ingurgitadas.

O corno não gravídico apresentava histotrofo disseminado pela superfície do endométrio. Nas zonas de topo ou cume praticamente só haviam células microvilosas de superfície plana, a exceção de algumas bocas de glândulas que estavam rodeadas de células mais convexas. A erosão da membrana ocorreu em algumas células. As células secretórias protusas se alojavam principalmente nas regiões mais fundas das calhas (Figura 4D). Nas amostras analisadas não foram encontradas células ciliadas no corno não gravídico.

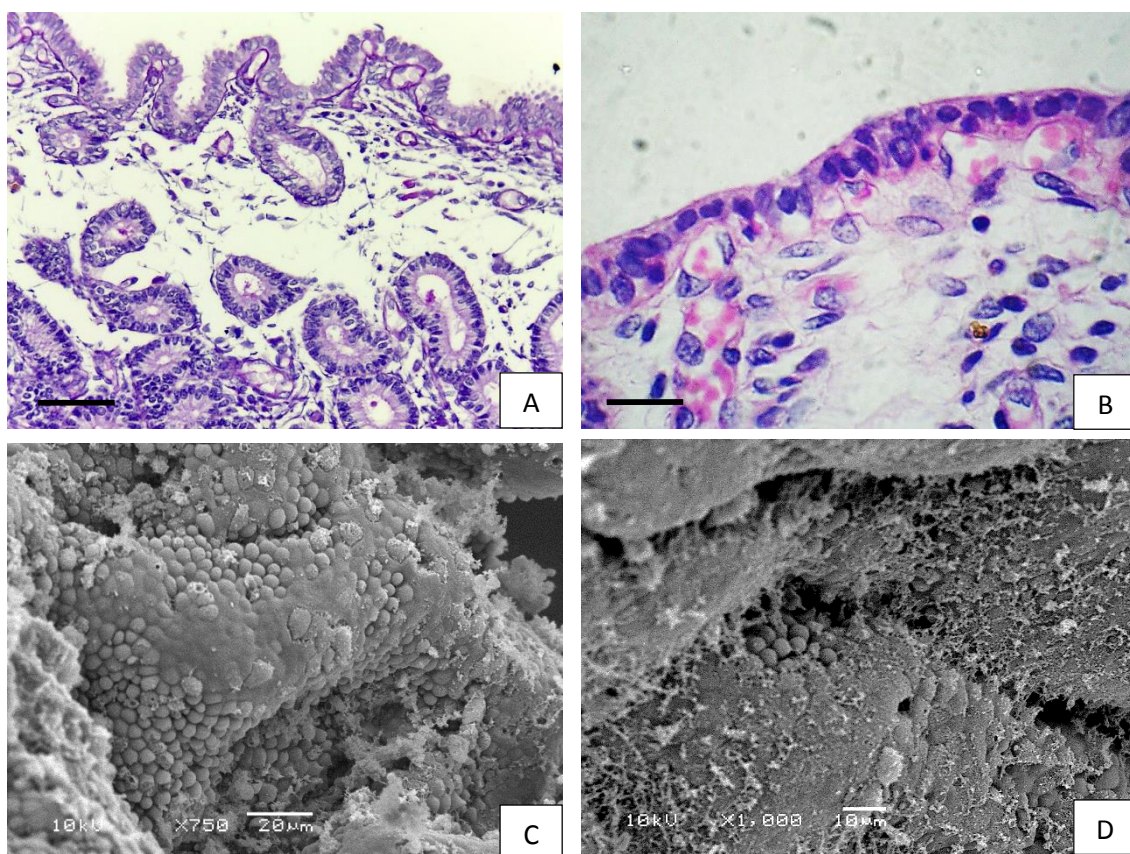


FIGURA 4. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 30 dias de gestação. (A) Epitélio luminal e glandular com células secretórias ativas, pseudoestratificado e pleomórfico (PAS – 400x, barra = 50µm). (B) Pleomorfismo celular do

epitélio luminal e do ducto da glândula. Regiões de pseudoestratificação do epitélio luminal intercalado com zonas de epitélio mais cúbico e aparente abundância de vascularização (HE – 1000x, barra = 15µm). (C) Eletromicrografia (750x) apresenta células ciliadas em pouca quantidade e apenas nos sulcos por entre o abundante histotrofo, células secretórias de superfície plana nos topos das dobras e protusas principalmente localizadas nos sulcos. As células ao redor das aberturas de glândulas continuavam geralmente ingurgitadas. (D) Eletromicrografia (1000x) mostra histotrofo disseminado pela superfície, nas zonas de cume praticamente só haviam células microvilosas de superfície planas e bocas de glândulas rodeadas de células mais convexas. As células secretórias protusas se alojavam principalmente nas regiões mais fundas das calhas.

### **35-36 dias de gestação**

O corno gravídico apresentou epitélio luminal colunar alto, com núcleos na porção média da célula, citoplasma abundante e vacúolos no terço basal (Figura 5A). Grande presença de células semelhantes aos linfócitos, acima e abaixo da membrana basal. Estes linfócitos também estão presentes no EC por entre a matriz extracelular e no epitélio de alguns ductos. As células da MEC no EC tem núcleo alongado. Sulcos no epitélio luminal estão presentes, mas aparentemente não são muito profundos. Muitos vasos capilares estão presentes, intimamente relacionado à membrana basal do epitélio luminal.

A altura do epitélio colunar foi tendência que se repetiu nos ductos, mas bastante diferente na região de glândulas onde os núcleos estão bem assentados na porção basal da célula, apesar da grande quantidade de citoplasma que toma forma espumosa na porção apical da célula. Nas porções média e basal das glândulas, há grande concentração e adensamento destas glândulas e focos de hiperplasia glandular disseminados pelo EE. Congestão e maior calibre dos vasos é percebida. Aparentemente há edema no estroma entre o EC e EE.

Nas amostras dos cornos não gravídicos analisadas pelo período de 35 e 36 dias de gestação observou-se zonas de sulcos endometriais formando



estruturas semelhante aos microsseptos, intercaladas com zonas de epitélio cúbico e plano. Há uma aparente lassidão do EC, com ductos das glândulas equidistantes (Figura 5B). O epitélio luminal apresentou sulcos mais profundos. Focos dispersos de hiperplasia celular foram identificados também na região média e de ductos das glândulas, mas em menor número e proporção do que o corno gravídico em mesma idade gestacional. Notou-se o desenvolvimento das porções basais da glândulas com maior enovelamento e adensamento dos ramos.

Por MEV, no corno gravídico aos 35 dias de gestação, o histotrofo se acumulava principalmente nas calhas ou sulcos, com poucas zonas de cumes apresentando material histotrófico (Figura 5C). Por outro lado, as bolhas de secreção foram visualizadas por toda amostra, e muitas delas por sobre as aberturas de glândula. Algumas células ciliadas foram encontradas nas bordas e nas calhas das dobras endometriais. As células microvilosas, de superfícies mais planas, mostravam claramente uma borda poligonal, algumas com erosões de membrana.

Já no corno não gravídico, a presença de histotrofo e bolhas secretadas foram muito menores em relação ao corno gravídico (Figura 5D). As erosões de membrana plasmática estavam presentes nas células secretoras de superfícies planas ou convexas. As células protusas estavam em menor proporção frente às planas que se estendem por topos, bordas e calhas das pregas endometriais. As aberturas de glândulas tampouco apresentavam células ingurgitadas ao seu redor. A formação de sulcos endometriais ficou mais evidente.

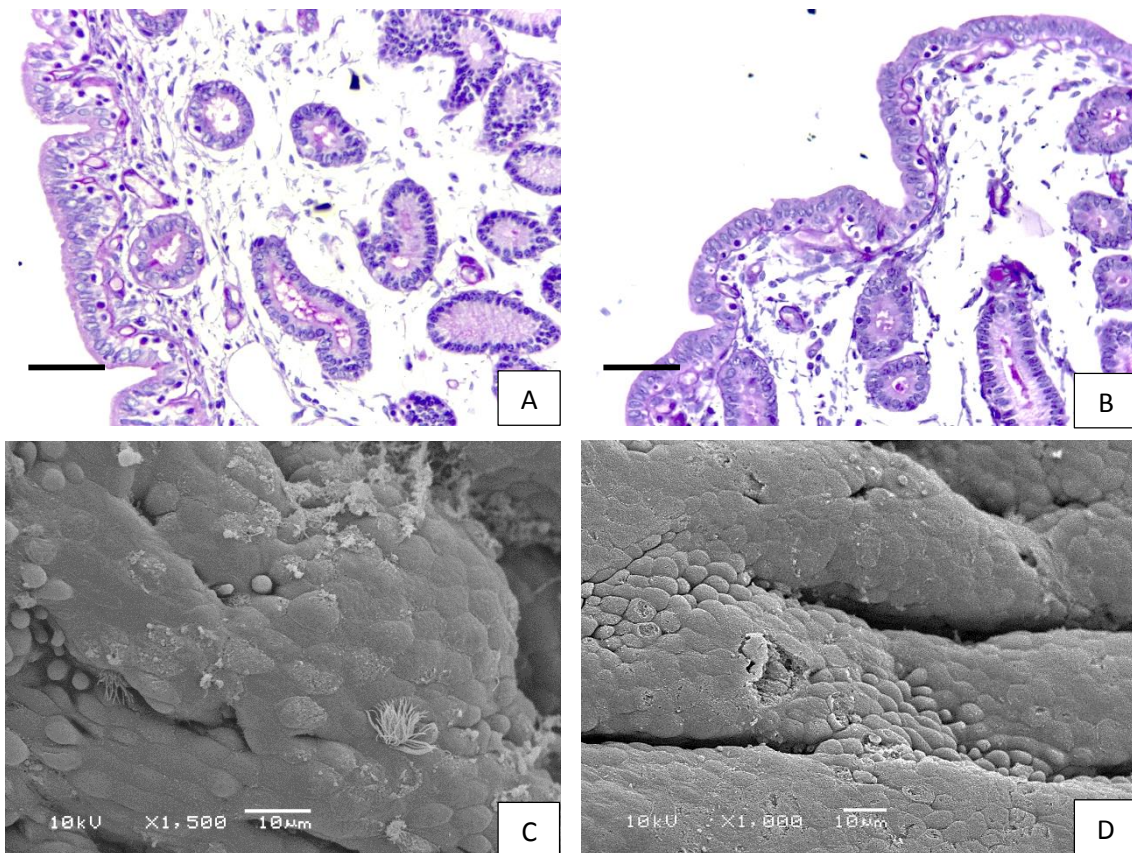


FIGURA 5. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 35 dias de gestação. (A) Epitélio luminal colunar alto, núcleos na porção média da célula com citoplasma abundante e vacúolos no terço basal. Grande presença de linfócitos no epitélio luminal, no estroma do EC e no epitélio de alguns ductos. As células da MEC no EC tem núcleo alongado, e muitos vasos capilares intimamente relacionado à membrana basal, um vaso linfático é encontrado no EC. Epitélio glandular hiperplásico, com núcleos bem assentados na porção basal da célula e grande quantidade de citoplasma que toma forma espumosa na porção apical da célula (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). (B) Epitélio luminal colunar médio à alto, núcleos posicionados na porção média da célula com vacúolos no terço basal. Algumas porções pseudoestratificadas e pleomórficas, presença de linfócitos intraepiteliais. EC aparentemente frouxo, permitindo a formação de sulcos (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). (C) Eletromicrografia (1500x) apresentando histotrofo acumulado nas calhas e vesículas secretórias aparentes nas bocas de glândulas. Raras células ciliadas foram encontradas nas bordas e calhas das dobras endometriais, onde as células microvilosas, de superfície mais plana e de borda poligonal apresentavam erosões de membrana. (D) Eletromicrografia (1000x) mostrando maiores sulcos e menor quantidade de histotrofo e bolhas secretadas em relação ao corno gravídico. Erosões de membrana plasmática presentes nas células secretoras de superfícies planas ou convexas sendo a maioria nos cumes bastante planos, e células secretórias ingurgitadas presente apenas nos bordos da calhas.

## **42 dias de gestação**

O epitélio luminal do corno gravídico é colunar simples, de tamanho médio, praticamente em toda sua extensão e poucas zonas com pleomorfismo celular são encontradas. O núcleo está posicionado no terço mediano da célula epitelial e vacúolos secretórios podem ser encontrados apical e basalmente. O epitélio luminal ainda apresenta células rompidas ou erodidas (vide figura suplementar 3). Alguns vacúolos de migração com linfócitos também puderam ser vistos por entre o epitélio luminal (Figura 6A). O endométrio apresenta várias pregas e sulcos no epitélio luminal, já bastante profundos, caracterizando o microsseptamento materno. A região do EC mostra uma redução da profundidade com maior adensamento do estroma e MEC comparado ao período anterior (35-36d), mas ainda assim mais profundo em relação ao diestro. E, também no EE, nota-se uma menor profundidade geral da lâmina própria e zonas intercaladas de maior e menor densidade glandular.

Há algum pleomorfismo celular no epitélio glandular, principalmente nos ductos das glândulas, que apresentam epitélio colunar baixo a médio e presença de células ciliadas frequentemente. O epitélio da glândula é colunar alto, bastante organizado, com núcleo ovalado posicionado na porção basal da célula.

O corno não gravídico aos 42 dias de gestação apresenta sulcos e microsseptamento em diferentes tamanhos e profundidades (Figura 6B). Vasos capilares são encontrados em maior quantidade, alguns mais calibrosos, e intimamente relacionados à membrana basal do epitélio acompanhando todas suas dobras e pregas. O epitélio luminal varia entre zonas de simples à pseudoestratificado. As células são colunares médias, com núcleo posicionado no terço médio. Vacúolos de migração são vistos contendo linfócitos, espalhados ao longo do epitélio luminal sobrepostos à membrana basal. Alguns

linfócitos também estão presentes no EC difusamente posicionados no estroma.

Focos de hiperplasia celular das glândulas aparecem difusamente no EE, na região média das glândulas endometriais. Células ciliadas são encontradas somente nas glândulas e ductos. As células das glândulas são colunares médias a altas, de núcleo oval posicionado basalmente e vacúolos secretórios apicais.

O corno gravídico aos 42 dias de gestação, apresentou na análise por MEV, dobras endometriais intercalando calhas e cumes, cujos topos estavam mais planos e achatados (Figura 6C). Os cumes do epitélio apresentaram grande proporção de células secretórias não ingurgitadas ou de superfície levemente convexas, bem delimitadas e muitas vezes erodidas com histotrofo acumulado (vide figura suplementar 4). Nas regiões de calhas ou sulcos as células apresentavam-se levemente protusas, sem erosões aparentes na membrana celular. Algumas células ciliadas foram visualizadas pelas aberturas dos ductos das glândulas. O histotrofo foi visto em contato com inúmeras células pelas calhas e cumes do epitélio.

Ainda por MEV, o corno não gravídico aos 42 dias de gestação evidenciou sulcos mais profundos em relação aos 35-36 dias. Algumas células ciliadas foram visualizadas pela superfície epitelial, e em maior quantidade nas aberturas dos ductos das glândulas (Figura 6D). O histotrofo pôde ser visto em contato com as células ciliadas. Os cumes do epitélio apresentaram grande proporção de células secretórias de superfícies planas ou levemente convexas, bem delimitadas e muitas vezes erodidas. Nas regiões de calhas ou sulcos as células protusas eram maioria, bastante ingurgitadas, e sem erosões aparentes.

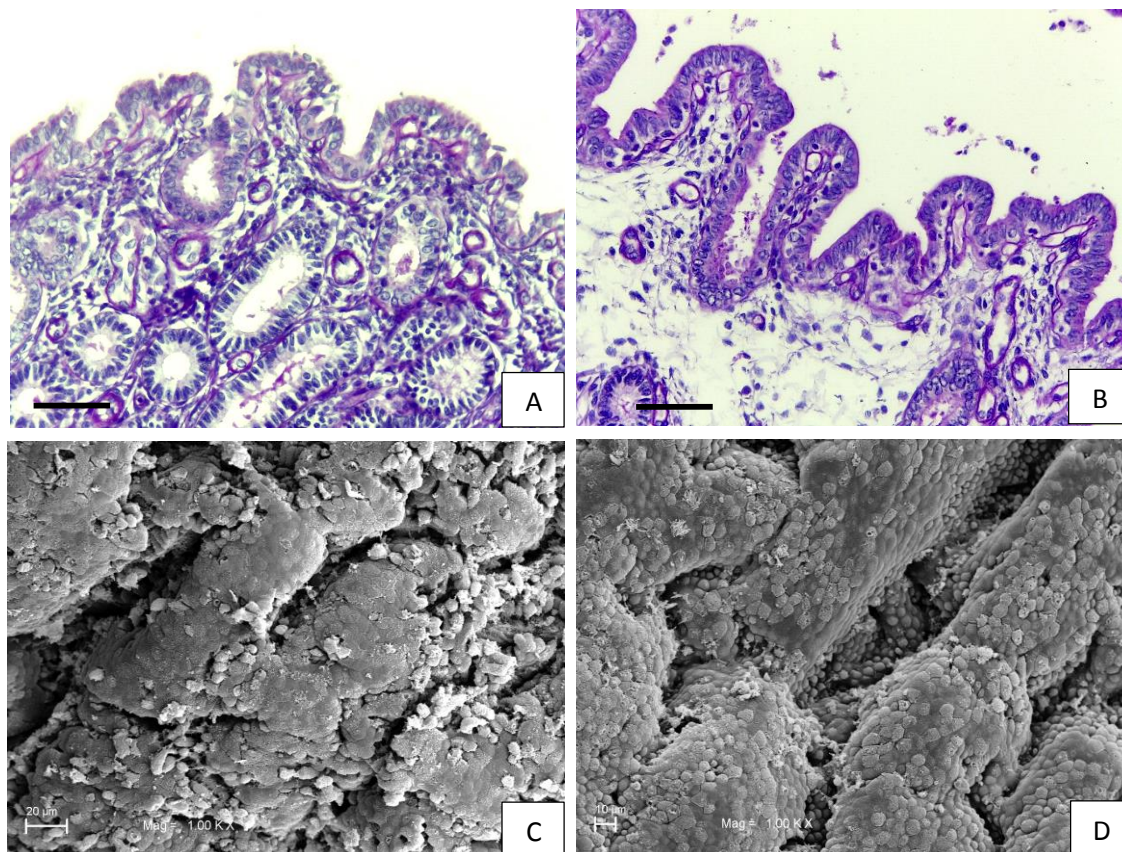


FIGURA 6. Fotomicrografias do endométrio nos cornos gravídico (A e C) e não gravídico (B e D) aos 42 dias de gestação. (A) Epitélio luminal colunar simples, de média altura, praticamente em toda sua extensão e poucas zonas com pleomorfismo celular e grupos de células nos topos em secreção apócrina ativa. O núcleo está posicionado no terço mediano da célula epitelial e vacúolos secretórios podem ser encontrados apical e basalmente. Alguns vacúolos de migração linfocitária estão presentes pelo epitélio luminal. Há pleomorfismo celular no epitélio glandular e nos ductos. O epitélio da glândula é colunar alto, organizado, com núcleo ovalado posicionado nas porção basal da célula (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). (B) Os sulcos estão evidenciados na superfície endometrial, cujo epitélio apresenta regiões de pseudoestratificação, pleomorfismo e vacúolos de migração transepitelial. O EC é menos denso e contém leucócitos mononucleares difusos (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). (C) Eletromicrografia (1000x) do endométrio do corno gravídico apresentando sulcos mais profundos ou septamento materno e cumes das dobras planos. Uma série de células secretórias apócrinas ativas, aparentando material recém secretado e outras já erodidas estão presentes nos cumes, e o histotrofo presente nas calhas. (D) Eletromicrografia (1000x) do corno não



gravídico com sulcos profundos aonde as células secretórias estão bastante protuberantes. Nos topos a maioria das superfícies das células está plana ou levemente convexa, geralmente erodidas, com algum histotrofo e eventuais células ciliadas presentes.

## **Desenvolvimento temporal entre os 21º, 30º, 35º e 42º dias de gestação**

### **Dos cornos gravídicos**

Observa-se com o avanço da gestação um aprofundamento do EE, isto é, aumenta o volume de ramos, extensão e enrolamento das glândulas. Também é sugestiva a maior concentração e adensamento das glândulas endometriais. Há também um aparente afrouxamento do SC, e epitélio luminal com pregas e sulcos, maiores aos 42 dias. O pleomorfismo, vigor secretório e pseudoestratificação do epitélio luminal são maiores aos 21 dias e diminuem aos 42 dias da gestação. A lâmina própria do endométrio no corno gravídico apresentou aumento progressivo em sua profundidade até o período dos 35-36 dias para apresentar aparente diminuição aos 42 dias de gestação (Figura 7 e Tabela 1).

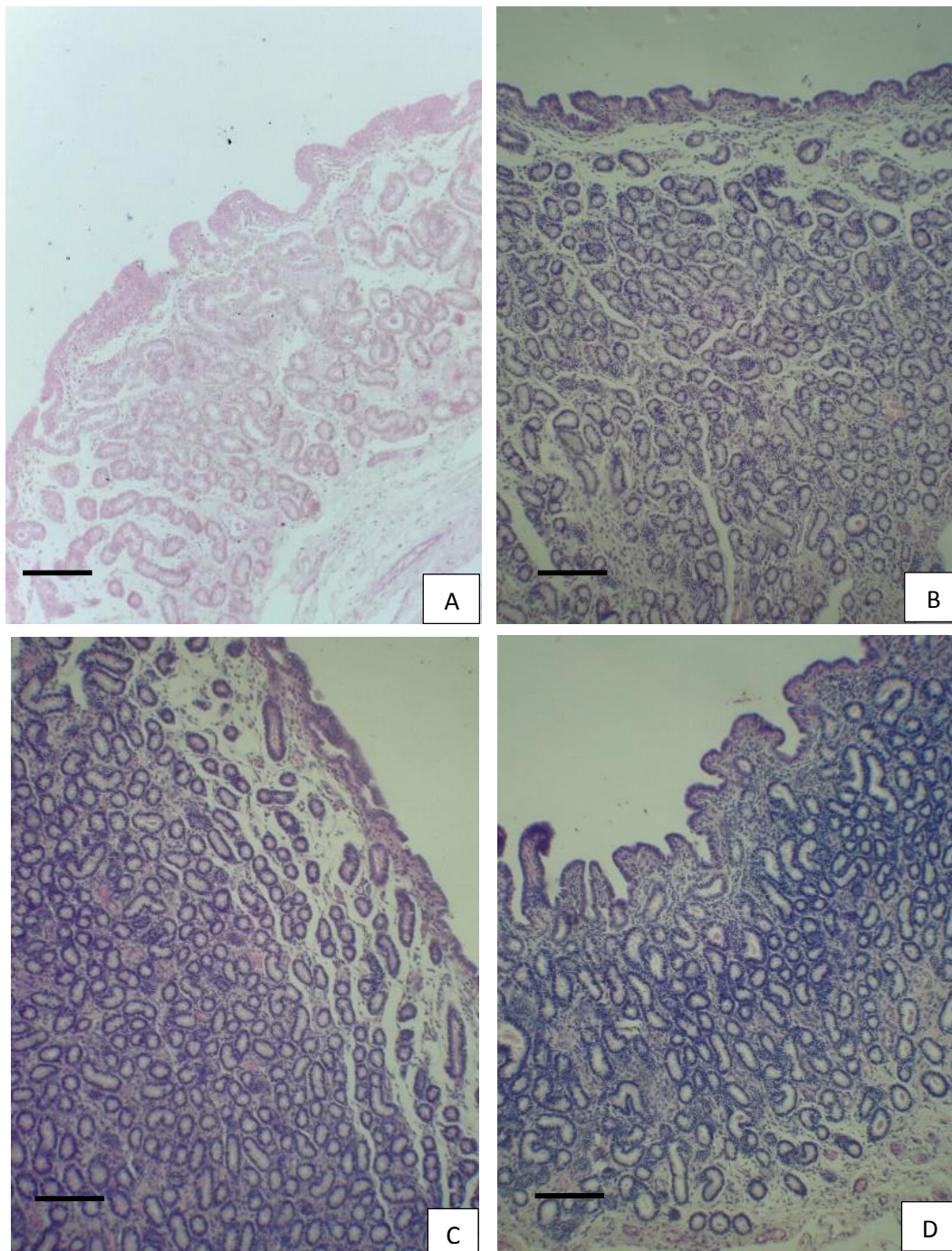


FIGURA 7. Fotomicrografias do corno gravídico de endométrio ao 21º (A), 30º (B), 35º (C) e 42º (D) dias de gestação mostrando a evolução temporal e adaptação endometrial à presença da vesícula embrionária. HE (A) e PAS (B, C e D) 100x, barra = 200µm.

### **Dos cornos não gravídicos**

Observou-se um aprofundamento do EE entre o período de 21 e 35 dias de gestação. Ao passo que nos 35 dias houve início da formação de sulcos e septamento do epitélio luminal acompanhado de afrouxamento do EC que permanece em menor grau aos 42 dias de gestação. Aos 21 dias o epitélio luminal apresenta pleomorfismo e pseudoestratificação que diminuem gradualmente aos 30, 35 e 42 dias, não desaparecendo totalmente até o final do período estudado. A profundidade da lâmina própria tendeu a diminuir com o avanço gestacional (Figura 8 e Tabela 1).



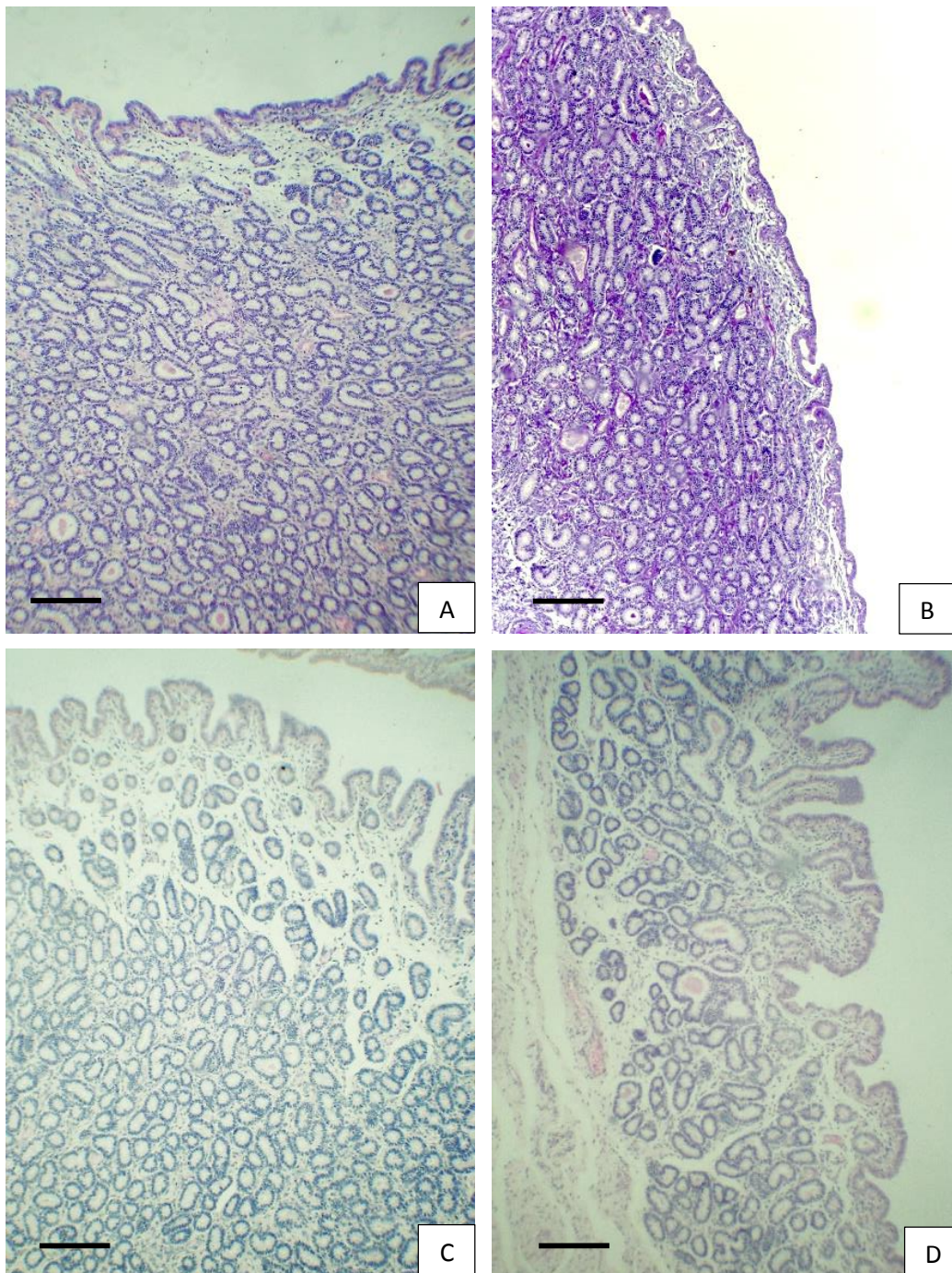


FIGURA 8. Fotomicrografias do corno não gravídico de endométrio ao 21º (A), 30º (B), 35º (C) e 42º (D) dias de gestação, mostrando a adaptação temporal da superfície endometrial. HE (A, C e D) e PAS (B) 100x, barra = 200µm.

TABELA 1. Desenvolvimento das características observadas por MEV e histologia ao diestro e entre os 21<sup>o</sup>, 24-25<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 35-36<sup>o</sup> e 42<sup>o</sup> dias de gestação em endométrio equino.

		Período					
		Diestro	21 dias	24-25 dias	30 dias	35-36 dias	42 dias
MEV	C. Ciliada	+++	+ nas calhas	ND	+ nas calhas	± nas calhas	+ nas calhas
	C. Secretória Protusa	+ protusas + erodidas	+++	ND	+++	++ erosão	++ nas calhas ++ secretórias de superfície planas e erodidas
	Histotrofo	( - ) a ±	+++	ND	+++	++	++
Histologia	Epitélio luminal	colunar baixo simples	colunar alto pseudo/pleom ± linfócitos	colunar médio a alto simples/pleom protusas, + linfócitos	colunar alto pseudo/pleom vacúolo basal, ++ linfócitos	colunar alto sulcos, vacúolo basal ++ linfócitos	colunar médio simples sulcos, + linfócitos
	EC	fino, sem edema	+++ ciliadas nos ductos	+++ ciliadas nos ductos, + linfócitos	++ ciliadas nos ductos +++ vasos ++ linfócitos	± frouxo e largo, +++ capilares + linfócitos	denso, ++ ciliadas nos ductos + linfócitos
	EE	sem edema	esparso, vasos, + edema	+++ hiperplasia	++ hiperplasia estroma frouxo	++ hiperplasia	+ hiperplasia, menor profundidade, denso
	Glândula endometrial	Colunar média, adensadas, + a ++ hiperplasia	colunar alto, pleom., hiperplasia, citoplasma floculado	colunar alto, + ciliadas	colunar alto, densas	colunar alto, densas	colunar médio, pleomorfismo

Legenda: MEV – microscopia eletrônica de varredura, C. – célula, EC – estrato compacto, EE – estrato esponjoso. ( - ) ausente, ± raro, + pouco, ++ intermediário, +++ abundante, pseudo – pseudoestratificado. pleom – pleomorfismo celular.

ND – Não disponível, as amostras para MEV dos dias 24 e 25 tiveram problemas técnicos ao realizar a MEV e serão repetidas.

## DISCUSSÃO

A característica inicial mais marcante da transformação ou adaptação endometrial à gestação é o quase total desaparecimento das células ciliadas na superfície epitelial em ambos cornos uterinos. Esta redução praticamente confina estas células aos ductos das glândulas e regiões mais protegidas do epitélio luminal, como nas calhas e sulcos endometriais.

Houve uma drástica diminuição da densidade de células ciliadas em relação ao encontrado no diestro, como recentemente relataram Souza et al. (2014) para o corno gravídico. Da mesma maneira, a redução desta população é enorme se observado ao diestro persistente (SAMUEL et al., 1979) ou até o 12º dia da gestação (KEENAN et al., 1991) ainda durante a fase de mobilidade embrionária (GINTHER, 1983) no lúmen uterino. Em éguas não gestantes a população de células ciliadas e não ciliadas passam por leves variações (SAMUEL et al., 1979; KEENAN et al., 1991; AL-BAGDADI et al., 2004) dependendo da localização no útero, das diferentes fases do ciclo estral e da sazonalidade. Na mulher a população de células ciliadas do endométrio é influenciada pelo estrógeno (MORE & MASTERSON, 1976), ao passo que a progesterona é o principal hormônio durante a gestação inicial como também ocorrem nos equinos (KASTELIC et al., 1987). Porém, não há diferença nos níveis séricos de progesterona durante o início da gestação e o diestro (KEENAN et al., 1991) que possa justificar esta redução da população de células ciliadas. Além do mais, as células ciliadas persistem em grande concentração nos ductos das glândulas (CAUSEY, 2007) e foram observadas nestes locais também no presente estudo em éguas gestantes. A renovação celular e a função das células ciliadas no endométrio equino ainda são desconhecidas, mas sabe-se que apresentam movimentos rítmicos

independentes de contrações uterinas (CAUSEY, 2007). O mesmo autor relata uma provável funcionalidade destas células, relacionadas aos mecanismos de defesa uterina em um sistema de limpeza mucociliar, tal qual no trato respiratório. Juntamente com o muco produzido por células endometriais, as células ciliadas, as calhas e sulcos do epitélio endometrial e o arranjo uterino das pregas do endométrio canalizando para a cérvix postulam a hipótese de um provável sistema de limpeza mucociliar ativo em éguas (CAUSEY, 2007). Considerando essa hipótese possível, a contínua limpeza mecânica mucociliar do lúmen uterino favoreceria a eliminação do histotrofo, suprimindo um fator que é essencial para a sobrevivência do embrião (BURTON et al., 2002; LEFRANC & ALLEN, 2007b; WILSHER & ALLEN, 2012) até a implantação e placentação a partir do 40º dia da gestação (SAMUEL et al., 1974, 1975). Talvez, a redução da população de células ciliadas do epitélio luminal durante a gestação seja uma interessante forma de favorecer o acúmulo de histotrofo. E, mantendo as células ciliadas dos ductos e glândulas, há um sinergismo em abastecer o lúmen com a produção histotrófica proveniente das glândulas, que na gestação inicial tem maior desenvolvimento (LEFRANC & ALLEN, 2007b; LEFRANC et al., 2014). Contudo, não se sabe ainda quais os fatores podem estar envolvidos neste processo de completa “deciliação” quando da presença de uma vesícula embrionária aos 21 dias. Não está claro, ainda, em que momento após a entrada do embrião à luz uterina as células ciliadas começam a reduzir sua população. E, mais ainda, se o próprio embrião determina este fato ao realizar o contato físico, o que talvez seja mais provável, na medida em que migra continuamente por todo endométrio desde sua chegada ao útero até a fixação na base de um dos cornos. Neste período o embrião equino secreta  $E_2$ ,  $E_1$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGE_2$  e fatores de crescimento promovendo uma intrincada interação embrio-maternal. Sua movimentação pelo endométrio se deve às prostaglandinas que favorecem localmente a contratilidade miometrial, ao mesmo tempo que fatores de crescimento favorecem a vasculogênese e hiperplasia celular. O estrógeno está ligado ao aumento de células ciliadas (MORE & MASTERSON, 1976) no entanto houve redução na sua população durante a gestação inicial na égua. Não se sabe se as prostaglandinas, agindo muito localmente, ou mesmo se algumas citocinas e fatores de crescimento ou

quais substâncias poderiam promover a deciliação. Há um verdadeiro quebra-cabeças acontecendo neste período. É possível, ainda, que este processo de deciliação do epitélio luminal esteja envolvido no chamado evento de reconhecimento materno da gestação (SHORT, 1969), em sinergismo à migração embrionária pela luz uterina. Mais estudos precisam ser realizados para confirmar ou descartar essas possibilidades.

Além do número e localização das células ciliadas, a capacidade de secreção das células microvilosas passou por mudanças com o avanço gestacional. Muitas células apresentaram erosões em sua superfície, provavelmente pela secreção apócrina das vesículas, ou mesmo pela descamação ou perda dos cílios. Observou-se que as células secretoras do epitélio endometrial desempenham um papel importante durante o primeiro bimestre da gestação, visto que as células secretórias arredondadas, ingurgitadas e protusas formam a maioria da população do epitélio, onde o histotrofo se acumula. E é possível que estas células protuberantes também participem do processo de hiperplasia endometrial, uma vez que aos 42 dias da gestação há um aparente retorno desta população. Este aumento na população das células protusas ocorre nos sulcos dos cornos grávidos e em maior escala no corno não grávidico. Ao mesmo tempo a transição de células secretórias ingurgitadas e ativas, localizadas na parte superior de dobras, adquirindo superfície mais plana com o avanço gestacional foi evidente e concomitante ainda à formação dos sulcos. A superfície endometrial claramente apresentou sulcos e septamento maior aos 42 dias em relação aos 21 dias de gestação, numa provável formatação de sítios de implantação entre endométrio e placenta.

Nosso estudo demonstrou ainda uma adaptação contínua da estrutura e morfofisiologia do endométrio equino durante o período pós fixação e peri-implantação da vesícula embrionária no corno grávidico. Uma visível remodelação epitelial em relação ao diestro ocorreu por efeito direto da presença do embrião no útero, inicialmente no corno grávidico por efeito direto, parácrino, da presença do embrião seguido de um rearranjo menos intenso no endométrio no corno não grávidico. Segundo Dallenbach-Hellweg et al. (2010)

os sinais histológicos induzidos por hormônios no endométrio nunca são uniformes, e as diferenças são devidas a vários fatores como, nutrição celular, suprimento vascular local e fatores metabólicos como receptores de estrógeno e progesterona. A remodelação do endométrio foi caracterizada pela hiperplasia celular glandular e também do epitélio luminal, este evidenciado pelo pleomorfismo celular e pseudoestratificação. O rearranjo das células após hiperplasia (pleomorfismo e pseudoestratificação) do epitélio luminal foi facilitado pela formação dos sulcos, ou septos maternos, expandindo a área de superfície endometrial.

Alguns estudos definiram as densidades das glândulas endometriais adaptando métodos estereológicos (LEFRANC & ALLEN, 2007b; SILVA et al., 2011) em locais e dias definidos do início da gestação em equinos. Embora a comparação direta entre estes resultados não é possível, pois a unidade e metodologia empregadas divergem, a quantidade ou a densidade da superfície glandular aumentou aparentemente com o avanço da idade gestacional (LEFRANC & ALLEN, 2007b; SILVA et al., 2011). A hiperplasia glandular é considerada uma característica normal dos períodos gestacional e pós-gestacional (pós-parto ou pós-abortamento) apresentando hipersecreção endometrial (RICKETTS, 1978; RICKETTS & TROEDSSON, 2007). De modo geral, os tecidos e órgãos do corpo estão normalmente sujeitos às influências de crescimento e regulação das demandas funcionais, portanto a hiperplasia é considerada uma resposta fisiológica a um estímulo específico. As células de crescimento hiperplásico continuam sujeitas aos mecanismos normais de controle regulador (GOSS, 1966) durante este estímulo.

Em uma simples contagem de glândulas no EE, seguindo o modelo adaptado de Silva et al. (2011) com contagem em campos aleatórios nas lâminas de histologia, obtivemos breves subsídios da diferença entre os cornos gravídico e não gravídico aos 35 dias de gestação, revelando cerca de 60% mais focos de hiperplasia no corno gravídico (dados não apresentados). Este dado corrobora o apresentado em éguas gestantes (SILVA et al., 2011), onde todas as camadas do endométrio são positivas para a presença de Ki-67, um marcador imunohistoquímico de proliferação celular. E, ocorre ainda um

crescente número de células marcadas com o avanço da gestação. Diferentemente, em éguas não gestantes, Gerstenberg et al. (1999) demonstraram maior proliferação celular durante o estro em células do epitélio luminal e EC incluindo estroma e ductos glandulares. Já as glândulas basais proliferam num curto período entre o 3º e 7º dias do diestro. Ainda, junto ao desenvolvimento do endométrio gestacional, ocorre um desenvolvimento de vasos sanguíneos, ocupando maior área relativa nos EC e EE do corno ipsilateral à vesícula embrionária (SILVA et al., 2011).

Em nosso estudo avançamos a análise até o 42º dia da gestação, quando virtualmente já existe a justaposição de tecido corioalantóide no endométrio dando início à placentação. Neste período foi evidenciado o septamento no epitélio luminal, com sulcos já sendo formados aos 35 e 36 dias, tornando-se mais profundos aos 42 dias de gestação. O microsseptamento do endométrio é formado por grandes dobras ou septos do epitélio luminal para acomodar microcotilédones e podem ser diagnosticadas em biópsias uterinas após a perda embrionária ou fetal (KENNEY, 1978). No entanto, não há microcotilédones neste período gestacional cuja formação só ocorre a partir dos 40 dias (SAMUEL et al., 1975). A principal diferença entre o microsseptos descrito por Kenney (1978) e este septamento inicial descrito neste trabalho, é o tamanho ou a profundidade dos sulcos nestas formações. Na análise aqui descrita parece ser plausível que houve efeito da presença e desenvolvimento embrionário-fetal e suas membranas na região de coleta das amostras justapostas ao concepto, como sugerem Allen & Wilsher (2009). Ainda que não exista uma parcela importante de tecido corioalantóide recoberto vasta extensão, o endométrio parece seguir sua transformação e expandir a área de superfície do lúmen como resultado de hiperplasia celular do epitélio luminal e afrouxamento do EC, para acomodar futuramente a membrana corioalantóide.

Análises abordando a vasculogênese e epiteliogênese, mensuradas através de marcadores imunohistoquímicos para VEGF e seus receptores, no endométrio (ALLEN et al., 2007; SILVA et al., 2011) de éguas cíclicas ou gestantes entre 14 e 30 dias foram publicadas. Dentre estes, Silva et al. (2011)

denotam presença de maior marcação positiva no epitélio luminal para o VEGF e maior marcação do receptor VEGFR2 no endotélio, algumas células do estroma, epitélios luminal e glandular, de éguas gestantes. O VEGF é ativado ou regulado também pelo estrógeno ( $E_2$ ) (ZIGMUNT et al., 2003), que durante a gestação é produzido em parte pelo próprio embrião (RAESIDE et al., 2009). A vesícula embrionária equina, ao transitar pelo útero durante a fase de mobilidade, promove alterações transitórias da perfusão vascular endometrial (SILVA et al., 2005). Uma sinalização entre concepto e endométrio ocorre por meio desta via, e provavelmente promova atividade mitógena de células endoteliais, do fator de permeabilidade de vasos de tecidos estrógeno-responsivos. A adaptação vascular uterina à crescente necessidade nutricional do concepto ocorre através de vasodilatação e do crescimento e desenvolvimento de novos vasos (ZIGMUNT et al., 2003).

Assim, a vasculogênese é esperada, bem como poderia haver edema subepitelial resultante do aumento de vasos e da própria permeabilidade vascular nas áreas endometriais próximas à vesícula embrionária (GRIFFIN et al., 1993), uma vez que o próprio embrião secreta e metaboliza  $E_2$  (RAESIDE et al., 2004) entre outras substâncias (RAESIDE et al., 2009). Estrógeno influencia a permeabilidade dos vasos, e parte da saída de água para o estroma ocorre em capilares e vênulas que possuem membrana semipermeável, permitindo a passagem de água mais livremente que proteínas. O próprio edema de tecidos pode ocorrer em função do  $E_2$ , como acontece ao endométrio durante o estro (HAYES et al., 1985; SAMPER & PYCOCK, 2007). De fato, o endométrio nos locais de contato e fixação dorsalmente à vesícula embrionária, é mais edematoso e hiperêmico do que qualquer outra área do endométrio vistos por histeroscopia (LEFRANC & ALLEN, 2007b) ou análise *in situ* (SILVA et al., 2011). O edema subepitelial no EC foi identificado à histologia em amostras coletadas aos 21 dias em CG e aos 24 dias em ambos cornos gravídico e não gravídico.

A migração das células trofoblásticas do anel coriônico embrionário ao endométrio ocorre partir do 36º dia de gestação (ALLEN & MOOR, 1972; ALLEN et al., 1973). Ao mesmo tempo, o estroma endometrial é rico em



leucócitos mononucleares (ENDERS et al., 1991) que se mobilizam ao redor destas células formando acúmulos nos cálices (ENDERS & LIU, 1991a, 1991b; ENDERS et al., 1991; GRÜNIG et al., 1995; LUNN et al., 1997). O epitélio luminal contém numerosos linfócitos granulares intraepiteliais, ao passo que linfócitos menores se acumulam no estroma e ao 42º dia permanecem confinados à periferia dos cálices (ENDERS & LIU, 1991b). Este acúmulo não é evidenciado ao longo da interface entre o endométrio e o córion não invasivo após a formação dos microcotilédones, onde há uma escassez de linfócitos (SAMUEL et al., 1974). A migração transepitelial destas células linfoides promove uma vacuolização da célula que pode ser identificada à histologia (KENNEY, 1978) nas diferentes fases do ciclo estral (RICKETTS, 1978). Nas amostras de ambos cornos gravídico e não gravídico a partir dos 21 dias do presente estudo, foram encontrados focos de linfócitos no epitélio luminal e focos dispersos pelo EC. E houve a presença de focos de linfócitos também aos 25 dias de gestação no epitélio de alguns ductos de glândulas endometriais. Estes linfócitos provavelmente são células exterminadoras naturais, as chamadas células NK (*Natural Killer cell*) já que partilham da mesma célula progenitora. Células NK foram originalmente descritas como linfócitos granulares grandes apresentando citotoxicidade natural, e depois reconhecidas como uma linhagem linfocítica separada (VIVIER et al., 2008). Elas povoam o útero atuando na vigilância do sistema imune contra patógenos durante a gestação, protegendo mãe e feto (RODRIGUES et al., 2013). As células NK encontradas no útero são denominadas uNK (*uterine Natural Killer cell*) e são os leucócitos mais abundantes no útero (BULMER et al., 2010). Em mulheres, as uNK são uma importante fonte produtora de fatores angiogênicos na gestação inicial (LASH et al., 2006) tais como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL-10), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento placentário (PIGF) e VEGF (LASH et al., 2010). Um interessante fator que constitui importante remodelação na arquitetura endometrial é o IFN- $\gamma$  que atua dilatando e afinando as paredes das artérias espiraladas para aumentar o fluxo sanguíneo para o sítio de implantação (ASHKAR et al., 2000) como ocorre em mulheres.

Em diversas espécies, as células NK do útero e decídua são distintas da população periférica em termos de fenótipo e função (CROY et al., 2006). Suas funções na gestação não estão completamente elucidadas, mas tem sido implicadas na remodelação vascular e facilitação da invasão trofoblástica (TABIASCO et al., 2006; HARRIS, 2011). Em equinos durante a gestação, as primeiras evidências da expressão de marcadores para células NK no endométrio foram relatadas recentemente (NORONHA et al., 2012). Estes autores sugerem que estas células uNK no equino atuem para facilitar a invasão trofoblástica e remodelação endometrial, em função semelhante à descrita para espécies de placentação hemocorial e que sofrem alterações nas artérias espiraladas no útero. Esta proposição poderia caracterizar uma funcionalidade das células NK em éguas com o intuito de preparar ou definir os sítios de implantação no endométrio. Isto também explicaria parte de nosso estudo, onde percebemos um aumento gradual da presença de linfócitos, provavelmente uNK, no epitélio endometrial desde o 21<sup>o</sup> até o 36<sup>o</sup> dia, quando ocorre a invasão trofoblástica. Seguida de uma leve diminuição na presença destes linfócitos aos 42 dias de gestação, quando os linfócitos migram para o entorno dos cálices endometriais.

Keenan et al. (1987) relatam a aparição de linfócitos, leucócitos e macrófagos no estroma, principalmente no EC, desde os primeiros dias após a ovulação em éguas vazias ou recém gestantes. A própria cápsula do embrião equino, que começa a desintegrar-se gradualmente por entre o 20<sup>o</sup> e 22<sup>o</sup> dias (BETTERIDGE et al., 1982; ENDERS & LIU, 1991a), promove uma reação leucocitária ao redor da cápsula no lúmen e no estroma endometrial (ALLEN & WILSHER, 2009). Interessante notar que os linfócitos, ou uNK, primariamente recrutados durante ou após o processo de perda da cápsula e posteriormente atraídos pelas células do anel coriônico, foram encontradas também no endométrio do corno não gravídico já aos 21 dias de gestação. É possível que, durante o período de mobilidade embrionária, anterior à fixação do concepto no corno gravídico, possa ter ocorrido alguma sensibilização pelo embrião ou pela cápsula embrionária ao endométrio, enviando sinais para a preparação e localização dos sítios de fixação e implantação, e as uNK intermedeiem

diretamente esta sinalização e transformação desde a entrada do embrião no útero. Em bovinos o sistema imunológico materno fica examinando ativamente o ambiente uterino no início da gestação (WALKER et al., 2010). O embrião modula esta resposta, induzindo a expressão de moléculas do endométrio, que funcionam para suprimir a resposta imune ou promover a tolerância para o embrião. Este sistema exige um controle complexo através da expressão de inibidores de proteção no endométrio, mas ainda não se sabe se o embrião expressa essas mesmas moléculas inibidoras (WALKER et al., 2010).

Portanto, é razoável admitir que o endométrio ao início da gestação por influência progesterônica (KASTELIC et al., 1987; GINTHER, 1992), por ação de estrógeno local (RAESIDE et al., 2004), de fatores de crescimento – vasculogênicos, mitogênicos e motogênicos (LENNARD et al., 1988, 1995; GERSTENBERG et al., 1999; ALLEN et al., 2007; SILVA et al., 2011), pela força mecânica da contratilidade miometrial (GINTHER, 1992; GASTAL et al., 1996) e pelo contato físico da vesícula embrionária, promova mudanças na arquitetura e estrutura endometrial, e uma transformação da superfície epitelial causando a redução da população de células ciliadas e hiperplasia celular de glândulas e do epitélio endometrial. E, que os sulcos ou septamento com um aparente afrouxamento do estrato compacto ocorram para acomodar o epitélio luminal, pseudoestratificado e por vezes pleomórfico, que está aumentando sua área superficial. Toda esta evolução e adaptação contínua aconteceram tanto no corno gravídico como no corno não gravídico. Porém, os eventos descritos no corno contralateral ao concepto foram evidenciados em menor intensidade.

#### 4. FIGURAS SUPLEMENTARES

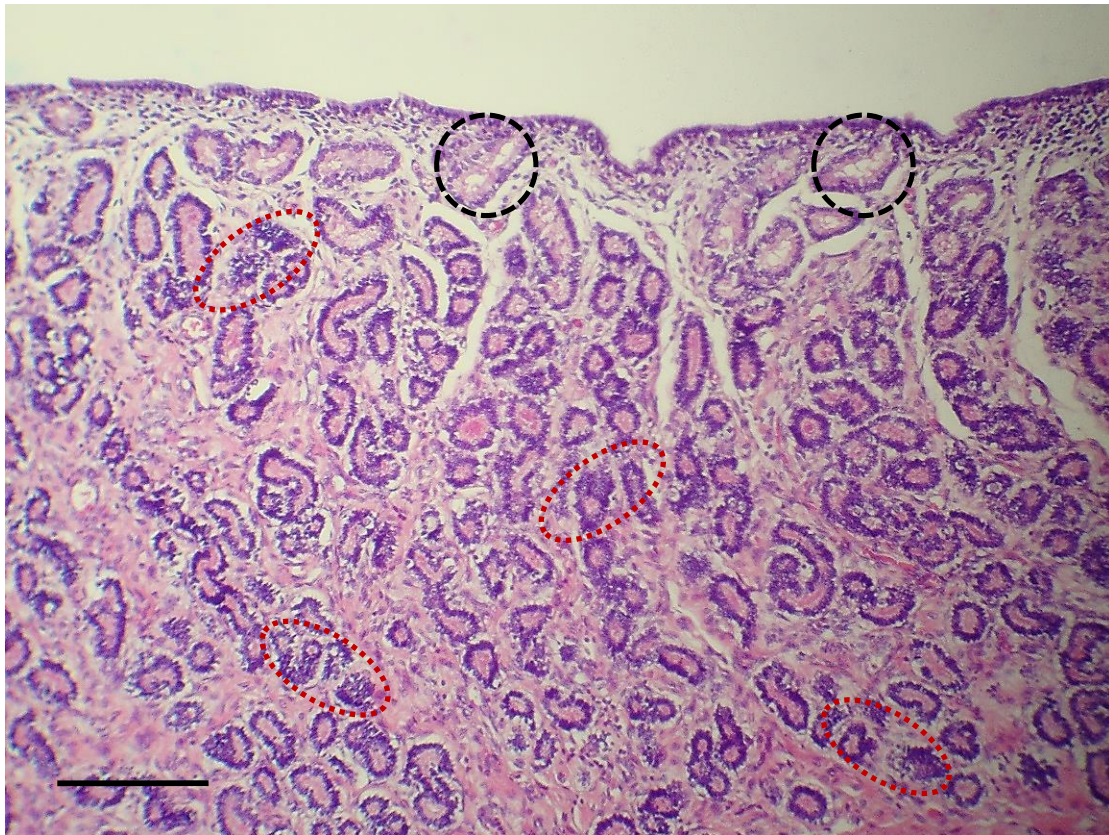


Figura suplementar 1. Fotomicrografia de endométrio equino ao diestro (HE – 200x, barra = 100 $\mu$ m). Epitélio luminal simples colunar baixo, núcleos posicionados na base da célula. Estrato compacto relativamente denso e curto. O epitélio glandular é colunar médio apresenta células ciliadas nos ductos (círculos). Hiperplasia celular glandular também está presente em diferentes zonas do estrato esponjoso (elipses).

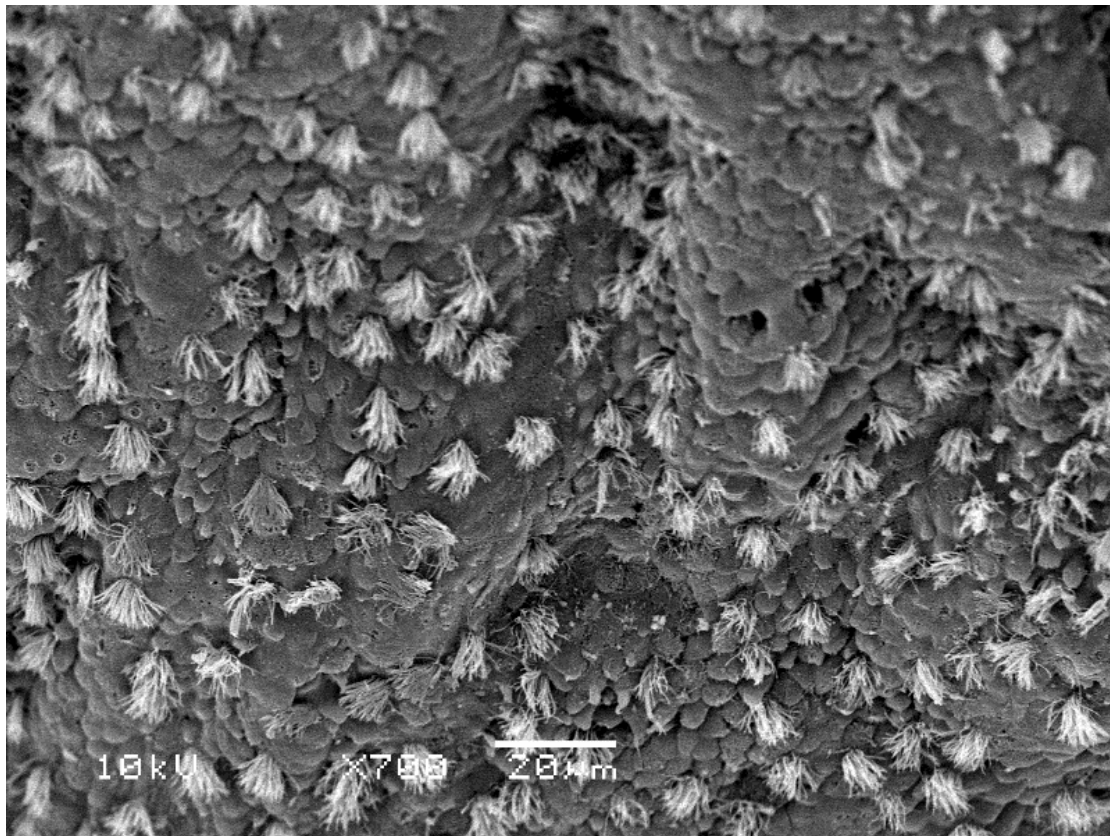


Figura suplementar 2. Eletromicrografia de endométrio equino ao diestro mostrando grande população de células ciliadas difusas e disseminadas entre as células microvilosas secretórias. As secretórias estão em sua maioria levemente convexas ou protusas, algumas com erosão de membrana. Bocas de glândula podem ser vistas e algum material secretório é encontrado nas calhas (MEV – 700x).



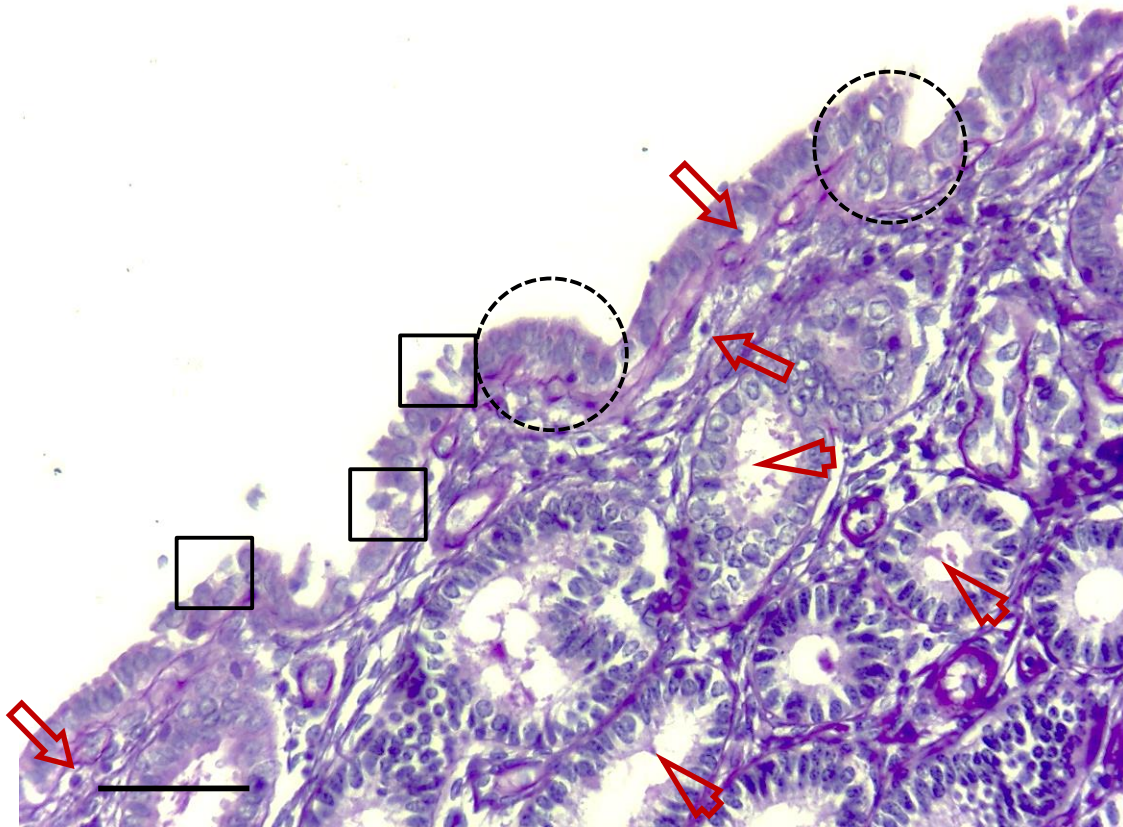


Figura suplementar 3. Fotomicrografia de endométrio equino aos 42 dias de gestação, corno gravídico (PAS – 400x, barra = 50 $\mu$ m). Epitélio luminal simples colunar médio e zonas com pleomorfismo celular (círculos). Vacúolos de migração transepitelial são encontrados, bem como linfócitos no estrato compacto (setas). O epitélio glandular apresenta células ciliadas nos ramos das glândulas e principalmente nos ductos (cabeça de seta). Hiperplasia celular glandular também está presente. O epitélio luminal ainda apresenta células rompidas ou erodidas, algumas com protusão do núcleo e conteúdo citoplasmático (quadrados), semelhante ao encontrado na MEV em Figura Suplementar 4.

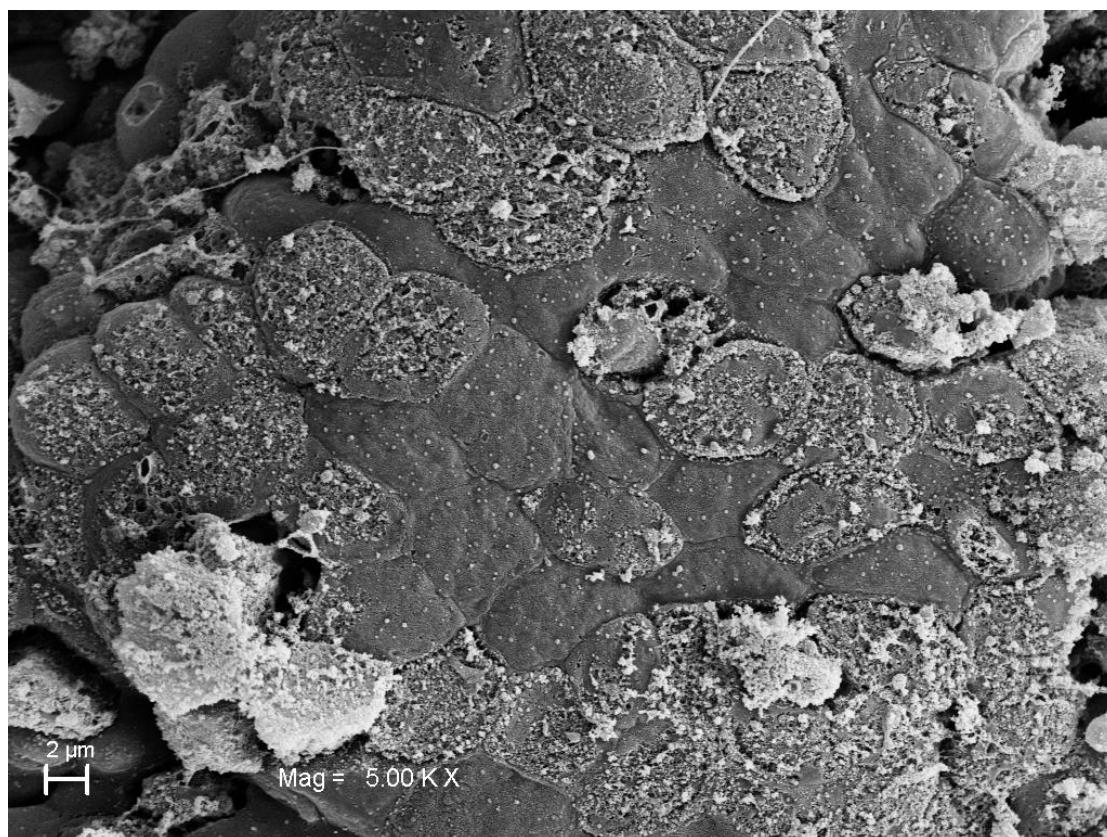


Figura suplementar 4. Eletromicrografia de endométrio equino aos 42 dias de gestação, corno gravídico. Cume do endométrio onde se visualizam células secretórias microvilosas. Muitas apresentam erosão da membrana plasmática em diferentes graus de lesão após secreção apócrina. O histotrofo está presente e se acumula nas calhas (MEV – 5.000x).

## 5. CONCLUSÃO

O declínio da população de células ciliadas da superfície epitelial do endométrio foi marcante no endométrio gestante.

O rearranjo das células do epitélio luminal ocorreu com o avanço da gestação após hiperplasia celular, culminando com a formação dos microseptos maternos.

A presença de linfócitos (uNK) na lâmina própria e epitélio luminal foi constante e apresentou aumento gradual até o dia 36 seguido de leve diminuição ao 42º dia da gestação.

Os eventos e adaptações do endométrio aconteceram em ambos os cornos uterinos, porém foram menos intensos no corno não gravídico.



## 6. REFERÊNCIAS

AL-BAGDADI FK, EILTS BE, RICHARDSON GF. Scanning Electron Microscopy of the Endometrium of Mares Infused with Gentamicin. **Microsc Microanal** 10; 280-85, 2004.

ALLEN WR, GOWER S, WILSHER S. Immunohistochemical Localization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Two Receptors (Flt-1 and KDR) in the Endometrium and Placenta of the Mare During the Oestrous Cycle and Pregnancy. **Reprod Dom Anim** 42; 516-26, 2007.

ALLEN WR, HAMILTON DW, MOOR RM. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. **The Anatomical Record** 177; 485-501, 1973.

ALLEN WR, MOOR RM. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. **J Reprod Fertil** 29; 313-16, 1972.

ALLEN WR, WILSHER S. Factors controlling microcotyledon development and placental efficiency in thoroughbreds: influences of mare age, parity, and nutritional insults. **Proceedings of a workshop on the equine placenta**, Lexington, 58-63, 2004.

ALLEN WR, WILSHER S. A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare. **Placenta** 30; 1005-15, 2009.

AMARAL D, CHIARINI-GARCIA H, VALE FILHO VR, ALLEN WR. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. **Arq Bras Med Vet Zootec** 56; 7-12, 2004.

ANTCZAK DF, DE MESTRE AM, WILSHER S, ALLEN WR. The equine endometrial cup reaction: a fetomaternal signal of significance. **Annu Rev Anim Biosci** 1; 419-442. 2013.

ASHKAR AA, DI SANTO JP, CROY BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J Exp Med** 192; 259-70, 2000.

BAE SE, WATSON ED. A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. **Theriogenology** 60; 909-21, 2003.

BARROS SS, MASUDA EK. **Biopsia endometrial na égua - diagnóstico e prognóstico**. 1ª edição. \_\_\_\_\_, Santa Maria: 30p., 2009.

BARROS SS, MASUDA EK. **Endometrial biopsy in the mare - diagnosis and prognosis**. 2<sup>nd</sup> edition. \_\_\_\_\_, Santa Maria, 49p., 2013.

BAZER FW, SPENCER TE, JOHNSON, GA, BURGHARDT, RC. Comparative aspects of implantation. **Reproduction** 139; 195-209, 2009.

BETTERIDGE KJ, EAGLESOME MD, MITCHELL D, FLOOD PF, BERIAULT R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy** 135; 191-209, 1982.

BETTERIDGE KJ. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. **Equine Vet J Suppl** 8; 92-100, 1989.

BETTERIDGE KJ. Comparative aspects of equine embryonic development. **Anim Reprod Sci** 60-61; 691-702, 2000.

BETTERIDGE KJ, WAELCHLI RO, SMITH AK, HAYES MA. Trophoblastic discs, yolk-sac tubercles and yolk-sac cords in the equine conceptus during the third and fourth weeks of pregnancy. **Havemeyer Foundation Monograph Series** 14; 3-4, 2005.

BETTERIDGE KJ. Equine embryology: An inventory of unanswered questions. **Theriogenology** 68S; S9-S21, 2007.

BULMER J, WILLIAMS P, LASH G. Immune cells in the placental bed. **Int J Dev Biol** 54; 281-294, 2010.

BURTON GJ, WATSON AI, HEMPSTOCK J, SKEPPER JN, JAUNIAUX E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab** 87; 2954-59, 2002.

CAUSEY RC: Mucus and the mare: How little do we know. **Theriogenology** 68; 386-94, 2007.

CROY BA, VAN DEN HEUVEL MJ, BORZYCHOWSKI AM, TAYADE C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. **Immunol Rev** 214; 161-85, 2006.

DALLENBACH-HELLWEG G, SCHMIDT D, DALLENBACH F. **Atlas of Endometrial Histopathology**. 3<sup>rd</sup> edition, Springer, Heidelberg, 245p., 2010.

DOIG PA, MCKNIGHT JD, MILLER RB. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. **Can Vet J** 22; 72-76, 1981.

DOIG PA, WAELCHI RO. Endometrial biopsy. In: Mckinnon AO, Voss JL (Eds.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.227, 1993.

ENDERS AC, LIU IKM. Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. **J Reprod Fert Suppl** 44; 427-38, 1991a.

ENDERS AC, LIU IKM. Trophoblast-uterine interaction during equine chorionic girdle cell maturation, migration, and transformation. **Am J Anat** 192; 366-81, 1991b.

ENDERS AC, LIU IKM, ALLEN WR. Endometrial lymphocytes and lymphatic vessels at the time of girdle cell migration in the horse. **Placenta** 12; 386-7. 1991.

FRANCIOLLI ALR, CORDEIRO BM, FONSECA ET, RODRIGUES MN, SARMENTO CAP, AMBROSIO CE, CARVALHO AF, MIGLINO MA, SILVA LA. Characteristics of the equine embryo and fetus from days 15 to 107 of pregnancy. **Theriogenology** 76; 819-32, 2011.

GASTAL MO, GASTAL EL, KOT K, GINTHER OJ. Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology** 46; 1171-80, 1996.

GERSTENBERG C, ALLEN WR, STEWART F. Factors controlling epidermal growth factor (EGF) gene expression in the endometrium of the mare. **Mol Reprod Dev** 53; 255-65, 1999.

GINTHER OJ. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology** 19; 603-11, 1983.

GINTHER OJ. Embryonic loss in mares: nature of loss after experimental induction by ovariectomy or prostaglandin F2a. **Theriogenology** 24; 87-98, 1985.

GINTHER OJ. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2<sup>nd</sup> edition. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices, 1992.

GINTHER OJ. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2. Horses**. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices, 1995.

GINTHER OJ. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. **AAEP proceedings** 44; 73-104, 1998.

GOSS RJ. Hypertrophy versus hyperplasia. **Science** 153; 1615-20, 1966.

GRIFFIN PG, CARNEVALE EM, GINTHER OJ. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Anim Reprod Sci** 31; 311-29, 1993.

GRÜNIG G, TRIPLETT L, CANADY LK, ALLEN WR, ANTCZAK DF. The maternal leucocyte response to the endometrial cups in horses is correlated with the developmental stages of the invasive trophoblast cells. **Placenta** 16; 539-59, 1995.

HARRIS LK. IFPA Gabor than award lecture: transformation of the spiral arteries in human pregnancy: key events in the remodelling timeline. **Placenta** 32 (Suppl. 2); S154-8, 2011.

HAYES KEN, PIERSON RA, SCRABA ST, GINTHER OJ. Effects of oestrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology** 24; 465-77, 1985.

HINRICHS K, KENNEY RM. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized mares. **J Reprod Fertil Suppl** 35; 439-43, 1987.

HOFFMANN C, ELLENBERGER C, MATTOS RC, AUPPERLE H, DHEIN S, STIEF B, SCHOON HA. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. **Anim Reprod Sci** 111; 261-78, 2009.

KASTELIC JP, ADAMS GP, GINTHER OJ. Role of progesterone in the mobility, fixation, orientation and maintenance of the equine conceptus. **Theriogenology** 27; 655-63, 1987.

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

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

KENNEY RM. Cyclic and pathologic changes in the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. **J Am Vet Med Assoc** 172; 241-62, 1978.

KENNEY RM, DOIG PA. Equine endometrial biopsy. In: Morrow DA (Ed.). **Current Therapy in Theriogenology**. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders, 723-29, 1986.

LASH GE, SCHIESSL B, KIRKLEY M, INNES BA, COOPER A, SEARLE RF, ROBSON SC, BULMER JN. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **J Leukoc Biol** 80; 572-580, 2006.

LASH GE, ROBSON S, BULMER J. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. **Placenta** 31S; 87-92, 2010.

LEFRANC AC, ALLEN WR. Influence of breed and oestrous cycle on endometrial gland density in the mare. **Equine Vet J** 39; 506-10, 2007a.

LEFRANC AC, ALLEN WR. Endometrial gland surface density and hyperaemia of the endometrium during early pregnancy in the mare. **Equine Vet J** 39; 511-15, 2007b.

LEFRANC AC, NETO V, BUFF S, GUÉRIN P, POHL O. Ultrastructure of the equine endometrium during natural and artificially induced prolonged dioestrus. **J Equine Vet Sci** 34; 182-3, 2014.

LEHMANN J, ELLENBERGER C, HOFFMANN C, BAZER FW, KLUG J, ALLEN WR, SIEME H, SCHOON HA. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. **Theriogenology** 76; 1326-36, 2011.

LEISER R, PFARRER C, ABD-ELNAEIM M, DANTZER V. Feto-maternal Anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. **Trophoblast Research** 12; 21-39, 1998.

LENNARD SN, GERSTENBERG C, ALLEN WR, STEWART F. Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. **J Reprod Fertil** 112; 49-57, 1998.

LENNARD SN, STEWART F, ALLEN WR. Transforming growth factor b1 expression in the endometrium of the mare during placentation. **Mol Reprod Dev** 42; 131-40, 1995.

LUNN P, VAGNONI KE, GINTHER OJ. The equine immune response to endometrial cups. **J Reprod Immunol** 34; 203-16, 1997.

MACDONALD AA, CHAVATTE P, FOWDEN L. Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. **Placenta** 21; 565-74, 2000.

MCDOWELL KJ, SHARP DC, GRUBAUGH W, THATCHER WW, WILCOX CJ. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biol Reprod** 39; 340-348, 1988.

MANSOUR GD, FERREIRA AMR, FERNANDES FT, HENRY M. Histomorphometry of epithelial structures of the mare's endometrium. **R Bras Ci Vet** 11; 44-48, 2004.

MORE IAR, MASTERSON RG. The role of oestrogen in the control of ciliated cells of the human endometrium. **J Reprod Fert** 47; 19-24, 1976.

NIKAS G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. **Human Reproduction** 14 Suppl 2; 99-106, 1999.

NIKAS G, AGHAJANOVA L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? **Reprod Biomed Online** 4 Suppl 3; 18-23, 2002.

NORONHA LE, HUGGLER KE, DE MESTRE AM, MILLER DC, ANTCZAK DF. Molecular evidence for natural killer-like cells in equine endometrial cups. **Placenta** 33; 379-386, 2012.

PYCOCK JF. Breeding management of the problem mare. In: **Equine breeding management and artificial insemination**. Samper JC (Ed.), 2<sup>nd</sup> edition, St. Louis: Saunders, 139-64. 2009.

QUINN C, RYAN E, CLAESSENS EA, GREENBLATT E, HAWRYLYSHYN P, CRUICKSHANK B, HANNAM T, DUNK C, CASPER RF. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. **Fertil Steril** 87; 1015-21, 2007.

QUINN CE, CASPER RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. **Human Reprod Update** 15; 229-36, 2009.

RAESIDE JI, CHRISTIE HL, RENAUD RL, WAELCHLI RO, BETTERIDGE KJ. Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium during early pregnancy in relation to estrogen concentrations in yolk-sac fluid. **Biol Reprod** 71; 1120-27, 2004.

RAESIDE JI, CHRISTIE HL. The presence of 19-norandrostenedione and its sulphate form in yolk-sac fluid of the early equine conceptus. **J Steroid Biochem Mol Biol** 108; 149-54, 2008.

RAESIDE JI, CHRISTIE HL, WAELCHLI RO, BETTERIDGE KJ. Estrogen metabolism by the equine embryo proper during the fourth week of pregnancy. **Reproduction** 138; 953-60, 2009.

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



RICKETTS SW, TROEDSSON MHT. Fertility expectations and management for optimal fertility. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (Eds.), St. Louis: Saunders, 53-69, 2007.

RODRIGUES MN, FAVARON PO, DOMBROWSKI JG, SOUZA RM, MIGLINO MA. Role of natural killer (NK) cells during pregnancy: A review. **Open Journal of Animal Sciences** 3; 138-44, 2013.

RODRIGUES MN, CARVALHO RC, FRANCIOLLI ALR, RODRIGUES RF, RIGOGGIO NN, JACOB JCF, GASTAL EL, MIGLINO MA. Prenatal Development of the Digestive System in the Horse. **Anat Rec (Hoboken)** 00; 00-00, 2014. In press.

RUIJTER-VILLANI M, BOXTEL PRM, STOUT TAE. Fibroblast growth factor-2 expression in the preimplantation equine conceptus and endometrium of pregnant and cyclic mares. **Theriogenology** 80; 979-89, 2013.

SAMPER JC, PYCOCK JF. The normal uterus in estrus. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (Eds.), St. Louis: Saunders, 32-35, 2007.

SAMUEL CA, ALLEN WR, STEVEN DH. Studies on the development of the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. **J Reprod Fert** 41; 441-45, 1974.

SAMUEL CA, ALLEN WR, STEVEN DH. Ultrastructural development of the equine placenta. **J Reprod Fert Suppl** 23; 575-78, 1975.

SAMUEL CA, ALLEN WR, STEVEN DH. Studies on the equine placenta. II. Ultrastructure of the placental barrier. **J Reprod Fert** 48; 257-64, 1976.

SAMUEL CA, ALLEN WR, STEVEN DH. Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. **J Reprod Fert** 51, 433-37, 1977.

SAMUEL CA, RICKETTS SW, ROSSDALE PD, STEVEN DH, THURLEY KW. Scanning electron microscope studies of the endometrium of the cyclic mare. **J Reprod Fert Suppl** 27; 287-92, 1979.

SCHLAFER DH. Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology** 68; 413-22, 2007.

SCHOON HA, SCHOON D. The Category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? **Pferdeheilkunde** 19; 698-701, 2003.

SHARP DC. The early fetal life of the equine conceptus. **Anim Reprod Sci** 60-61; 679-89, 2000.

SHORT, RV. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: **Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy**. Wolstenholme GEW, O'Connor M (Eds.), London: J & A Churchill, 2-26, 1969.

SILVA LA, GASTAL EL, BEG MA, GINTHER OJ. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biol Reprod** 72; 755-61, 2005.

SILVA LA, GINTHER OJ. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biol Reprod** 74; 337-43, 2006.

SILVA LA, KLEIN C, EALY AD, SHARP DC. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. **Reproduction** 142; 593-603, 2011.

SOUZA AM, WINTER GHZ, CAZALES N, MIGLINO MA, MATTOS RC. Endometrial surface adaptive changes during first half of pregnancy in mares. **J Equi Vet Sci** 34; 204-6, 2014.

STEVEN DH, JEFFCOTT LB, MALLON KA, RICKETTS SW, ROSSDALE PD, SAMUEL CA. Ultrastructural studies of the equine uterus and placenta following parturition. **J Reprod Fert Suppl** 27; 579-85, 1979.

STEWART F, LENNARD SN, ALLEN WR. Mechanisms controlling formation of the equine chorionic girdle. **Biol Reprod Monogr Series 1**; 151-9, 1995.

STOUT TAE, ALLEN WR. Prostaglandin E2 and F2a production of equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction** 123; 261-8, 2002.

TABIASCO J, RABOT M, AGUERRE-GIRR M, EL COSTA H, BERREBI A, PARANT O, LASKARIN G, JURETIC K, BENSUSSAN A, RUKAVINA D, LE BOUTEILLER P. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties e a review. **Placenta** 27(Suppl. A); S34-9, 2006.

TOLOSA EMC, RODRIGUES CJ, BEHEMER OA, FREITAS-NETO AG. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ª edição. Ed. Manole. Barueri, São Paulo. 2003.

VAN NIEKERK CH, ALLEN WR. Early embryonic development in the horse. **J Reprod Fert Suppl** 23; 495-8, 1975.

VANDERWALL DK. Early embryonic loss in the mare. **J Equi Vet Sci** 28; 691-702, 2008.

VANDERWALL DK, NEWCOMBE JR. Early embryonic loss. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (Eds.), St. Louis: Saunders, 374-83, 2007.

VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, WALZER T, UGOLINI S. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology** 9; 503-10, 2008.

WALKER CG, MEIER S, LITTLEJOHN MD, LEHNERT K, ROCHE JR, MITCHELL MD. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. **BMC Genomics** 11; 474, 2010.

WALTERS KW, ROSER JF, ANDERSON GB. Maternal-conceptus signalling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor I. **Reproduction** 121; 331-8, 2001.

WEBBER JA, FREEMAN DA, VANDERWALL DK, WOODS GL. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport stage equine embryos. **Biol Reprod** 45; 540-3, 1991.

WEBBER JA, WOODS GL, LICHTENWALNER AB. Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. **Biol Reprod Monogr Series** 1; 125-30, 1995.

WILSHER S, ALLEN WR. Factors influencing placental development and function in the mare. **Equine Vet J** 44; 113-9, 2012.

ZYGMUNT M, HERR F, MÜNSTEDT K, LANG U, LIANG OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur J Obstet Gyn Reprod Biol** 110; S10-S18, 2003.

## **ANEXO A**

ARTIGO publicado, apresentação oral em *International Symposium on Equine Reproduction* - ISER XI – Hamilton, Nova Zelândia, janeiro de 2014.

Souza AM, Winter GHZ, Cazales N, Miglino MA, Mattos RC. Endometrial surface adaptive changes during first half of pregnancy in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 34 (2014) 204-06.

### **Endometrial surface adaptive changes during first half of pregnancy in mares**

AM Souza\*<sup>1</sup>, GHZ Winter<sup>1</sup>, N Cazales<sup>1,2</sup>, MA Miglino<sup>3</sup>, RC Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> REPROLAB – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Facultad de Veterinaria – UDELAR, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup> Departamento de Cirurgia – USP, São Paulo, Brazil

## **1. Introduction**

Placentation involves considerable growth and reorganization of both fetal and maternal tissues [1] and the development of the microscopic structure of the fetal equine placenta have been relatively well documented during the first 210 days of gestation [2]. There is a lack of data on endometrial surface ultrastructural changes during early pregnancy in mares. In the present study

the three-dimensional endometrial surface morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM) in the first half of gestation in the mare.

## **2. Materials and methods**

Endometrial samples were collected from a commercial equine abattoir from mixed breed mares. Pregnant reproductive tracts with different gestational ages were identified and samples collected from pregnant horn and fixed in 2.5% phosphate glutaraldehyde solution. Each gestational age was defined using embryonic vesicle morphology until 40 days of pregnancy [1]. Fetal crown-rump measurements were performed for the others [1]. To this work 21, 30, 35, 62, 119, and 149 days of pregnancy were selected (n=6). For preparation for SEM, the samples were washed with PBS and dehydrated through a graded series of acetones, dried in a critical point drier using carbon dioxide (Balzers CPD030), mounted on aluminum stubs and sputter coated with 20 nm gold (Balzers SCD050). The specimens were examined using a JSM-6060 SEM operated at 10 kV and images saved as TIFF files.

## **3. Results**

The luminal epithelium of mares under progesterone influence is clearly composed of two cells types: ciliated cells and secretory cells that vary from protruded round to flattened polygonal shapes. These secretory cells clearly present microvilli. No prociliated cells were distinguished. Openings of

endometrial glands are seen diffusely on the endometrial surface and vesicles of secretory material were often seen. The folds were separated primarily by deep grooves. Small secondary ridges and troughs were observed along the course of the larger primary folds. At 21 days of pregnancy the ciliated cells are often localized only on troughs and borders of ridges and are surrounded by abundant secretory cells. The major populations of secretory cells were protruded in a “bunch of grapes” appearance and secreted histotrophe was visible. There was a minor population of flattened secretory cells with a slightly convex surface located on top of the endometrial folds. Erosion of secretory cells was found more on round protruded cells (Figure 1A, Table 1). At day 30 of pregnancy the ciliated cells were localized on troughs and few in number, between the histotrophe. Abundant histotrophe was clearly seen over the ridges and folds. There was an increase in the number of flattened secretory cells on the top of folds, some of them were eroded. The protruded cells were mainly located at the grooves where numerous blebs of secretory vesicles were seen (Figure 1B, Table 1). At 35 days of pregnancy the histotrophe accumulated mainly on the troughs, blebs of secretory vesicles were seen diffusely in the sample and many of them could be seen over the mouth of the glands. Some ciliated cells were found at the troughs and ridges border. The flattened cells on the top of folds were hexagonal and less convex; some of them were eroded and others presented a rim of microvilli at the cell border (Figure 1C, Table 1). At 62 days of pregnancy the endometrium appeared smooth and flat, the grooves were much shallower. There were still eroded secretory cells, but ciliated cells were not seen. Gland openings and secretory vesicle blebs were easily seen. Histotrophe was not spread but instead localized to defined areas

(Figure 1D, Table 1). The endometrium sample at 119 days of pregnancy was rather flat, and microvilli formed a hexagonal rim border on the abundant flattened secretory cells. No ciliated cells were found. As at 62 days of pregnancy, histotrophe was not spread but was localized to defined areas (Figure 1E, Table 1). At 149 days of pregnancy the endometrium appeared wrinkled and a novel structure appeared, presumed to be microcaruncles, cavities that receive the microcotyledons from the chorioallantoic membrane. The borders of the cells were barely appreciable, and some secreted vesicles were still visible, but histotrophe was not (Figure 1F, Table 1).



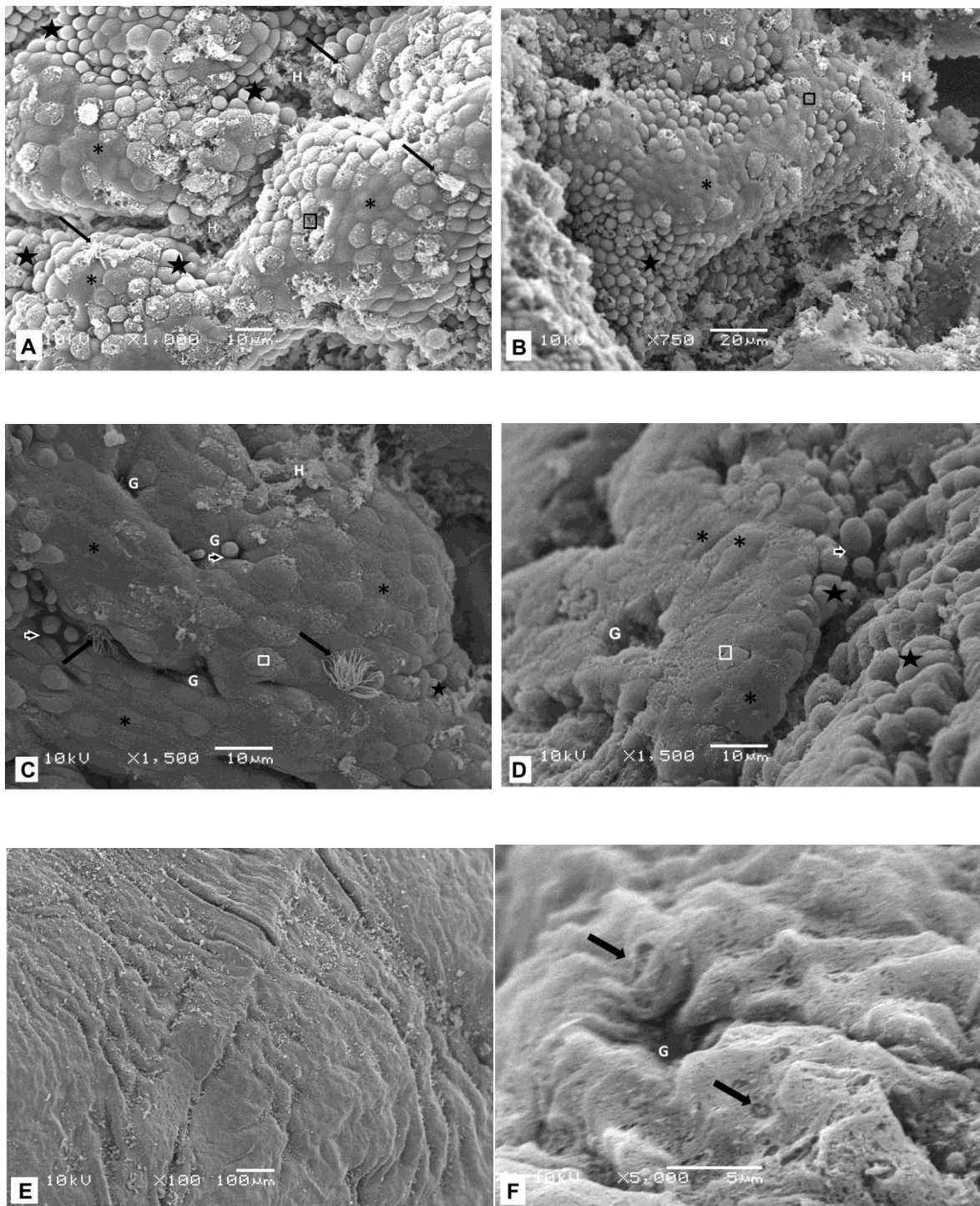


Figure 1. Scanning electron micrograph of endometrium of a mare A) at 21 days of pregnancy, B) at 30 days, C) at 35 days of pregnancy and D) at 62 days of pregnancy showing: protruded microvillus secretory cells (stars), flattened secretory cells on top of folds (asterisk), ciliated

cells (arrows), eroded secretory cells (square), glandular opening (G) with secreted vesicle blebs (arrow head) and histotrophe (H) accumulated on troughs. E) Micrograph at 119 days of pregnancy, with irregularly orientated ridges separated by grooves. F) Micrograph at 149 days of pregnancy, showing a wrinkled aspect of endometrium, glandular opening (G) and microcaruncle formation (arrows).

Table 1. Overall adaptive changes of endometrial surface during first half of pregnancy in mares (n=6).

Days of pregnancy	Secretory cell	Ciliated cell	Ridge/Troughs	Histotrophe
21	Some eroded cells, "bunch of grapes" appearance	Present on troughs	Marked	Accumulated on troughs
30	Flat cells on top of folds some with erosion, round cells on grooves	Only a few, on ridges border		
35	Many eroded cells Secretory blebs seen on mouth glands		Noticeable	
62	Eroded cells Secretory blebs, Flat cells, mouth glands apparent	Not seen	Smooth surface, shallow grooves	Localized on defined portions
119	Flattened cell, microvilli forming hexagonal border		Endometrium rather flat	
149	Microcaruncle formation		Wrinkled endometrium	Absent

#### 4. Discussion

This is the first study that compares and shows endometrial organization and adaptation during the initial half of pregnancy using scanning electron microscopy. Mainly adaptive changes were noticed in the number and position of ciliated cells as well as secretory power of the rounded and flattened cells. Many of cells showed erosions on their surface, maybe due to secretion of vesicles, deciliation or sloughing off. As described in non-pregnant equids [3,4] the population of ciliated and non-ciliated cells varies greatly depending on uterine location and may vary at different stages of the estrous cycle and season. This study shows a rapid pattern of changes from 21 days of gestation in the pregnant horn's endometrium, when compared to previous descriptions of late and persistent diestrus [3]. This period falls almost three weeks earlier than interdigitation of trophoblastic cells from the conceptus with the endometrium. It was observed that secretory cells play a major role during first trimester of gestation since rounded and engorged cells were the majority of the population in the endometrium. The transition from engorged and active rounded cells located at the top of folds to more flattened ones as gestational advances was evident. As gestation reached around 120 days the endometrial surface appeared to be smoother and rather flat, probably due to almost full formation of placenta and reduction in the height of the endometrium [5], and by 150 days was taking on a more wrinkled aspect. At this time the formation of microcaruncles were discernible at higher magnification. In this study, a rapid pattern of changes in endometrial cells and surface during the initial period of pregnancy was demonstrated.

## Acknowledgments

Thanks to CNPq, CAPES and FAPERGS for financial support. Also we are thankful to Electronic Microscopy Centre, UFRGS.

## References

- [1] Ginther OJ. Reproductive biology of the mare – basic and applied aspects. 2<sup>nd</sup> ed. Cross Plains: Equiservices; 1992.
- [2] Macdonald AA, Chavate P, Fowden AL. Scanning electron microscopy of the microtiledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. Placenta 2000 (21)565-574.
- [3] Samuel CA, Rickets SW, Rossdale PD, Steven DH, Thurley KW. Scanning electron microscope studies of the endometrium of the cyclic mare. J Reprod Fert Suppl 1979 (27)287-292.
- [4] Abd-Elnaeim MM. Morphological characteristics of the donkey (*Equus asinus*) uterus during estrus: light, scanning and transmission electron microscopic study. J Agric Vet Sci (Qassim University) 2008 (1)47-57.
- [5] Samuel CA, Allen WR, Steven DH. Ultrastructural development of the equine placenta. J Reprod Fert Suppl 1975 (23)575-578.

