

BÁRBARA KOLECHA COSTA

**Análise Esteroidogênica da membrana corioalantóide de equídeos**

São Paulo

2024

BÁRBARA KOLECHA COSTA

**Análise Esteroidogênica da membrana corioalantóide de equídeos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciência.

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução

**Orientador:**

Prof. Dr. Claudia Barbosa Fernandes



De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador

São Paulo

2024

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo  
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Costa, Bárbara  
Análise Esteroidogênica da membrana coricalantóide de equídeos /  
Bárbara Costa ; orientador Cláudia Barbosa Fernandes - versão  
corrigida.-- São Paulo, 2024.  
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Reprodução  
Animal - Departamento de Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Placenta. 2. hormônios. 3. progesterona. 4. estrógenos. I.  
Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação  
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Morfometria e esteroidogênese da membrana corioalantóide de éguas gestantes de produtos muare", protocolada sob o CEUA nº 2649170519 (ID 006852), sob a responsabilidade de **Cláudia Barbosa Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/08/2019.

We certify that the proposal "Morphometry and steroidogenesis of the chorioallantoic membrane of mares carrying hybrid pregnancies", utilizing 10 Equines (10 females), protocol number CEUA 2649170519 (ID 006852), under the responsibility of **Cláudia Barbosa Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2019 a 08/2020 Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **5 a 20 anos**

Quantidade: **10**

Linhagem: **Mangalarga Paulista**

Peso: **400 a 600 kg**

São Paulo, 28 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo



## Certificado da Comissão de Ética (obrigatório)



### Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DO MACRO AOS GENES DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE ÉGUAS GESTANTES DE CLONES EQUINOS", protocolada sob o CEUA nº 3477230720 (00 000270), sob a responsabilidade de **Cláudia Barbosa Fernandes** e equipe: *Francieli Pereira Carneiro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/08/2020.

We certify that the proposal "FROM MACRO TO GENES OF THE CHORIOALANTHOID MEMBRANE OF PREGNANT MARES OF EQUINE CLONES", utilizing 20 Equines (20 females), protocol number CEUA 3477230720 (00 000270), under the responsibility of **Cláudia Barbosa Fernandes** and team: *Francieli Pereira Carneiro* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/12/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 09/2020 a 05/2021      Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **5 a 15 anos**

N: **20**

Linhagem: **Mangalarga**

Peso: **350 a 550 kg**

Local do experimento: Empresa InVitro Brasil Clonagem Animal, Rodovia SP 340, Campinas ☐ Mogi-Mirim, Km 166, localizada na cidade de Mogi-Mirim, estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 22°25'54" sul; Longitude: 46°57'28" oeste; Altitude: 631 metros). Fazenda Santa Rita II, Rodovia Aldo Bolini, km 82 localizada em Piracaia, no estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 23°03'14" sul; Longitude: 46°21'29" oeste; Altitude: 792 metros).

São Paulo, 05 de setembro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: COSTA, Bárbara Kolecha

Título: Análise esteroidogênica de membrana corioalantóide de equídeos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico à minha família, especialmente minha mãe que esteve sempre do meu lado,  
e aos meus amigos que fizeram essa caminhada ser mais doce e leve

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente à minha família, que esteve ao meu lado em toda caminhada, que sempre me apoiou e nunca me deixou desistir. Minha mãe que passou tudo comigo, mesmo não estando junto fisicamente o tempo todo, ao meu pai que acompanhou toda essa caminhada. Essa conquista é de vocês.

Agradeço especialmente à minha orientadora Prof. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, que me guiou nessa caminhada; por toda paciência, ensinamento, puxões de orelha. O que eu aprendi nesses anos, ficarão guardados por toda minha vida.

À professora Yatta Linhares Boakari e ao professor Antônio Chaves de Assis Neto por gentilmente aceitarem o convite para compor a banca. Vocês são muito importantes nesse trajeto. Obrigada por toda colaboração durante o período do mestrado.

Agradeço à Dr. Danielle Calado por todos os ensinamentos, sem você, grande parte desse projeto não existiria.

Agradeço à minha grande amiga Francieli, que se tornou minha irmã dentro do mestrado, que me ajudou a passar por todos esses anos, alegrando e trazendo diversão, por todas as nossos happy hours, tours, risadas, histórias. Nada vai superar o que vivemos em muitos períodos do mestrado. Obrigada por ser meu ombro amigo nos momentos de desespero, você foi essencial nessa caminhada.

Obrigada a todos os professores e alunos do departamento VRA que estenderam a mão quando necessário, estar entre vocês já foi um sonho, e se tornou realidade.



Agradeço à todos os amigos de São Paulo que acabaram se tornando família, e passaram por tudo isso comigo: Julia, Samara, Kelly, Duda, Nicole, Yuri, Vini, Livia, Bia, My.

Aos meus amigos de longa data que já me acompanham desde antes de tudo: Ana Julia, Maria Eduarda, Camila.

Às minhas amigas da pós-graduação de dermatologia que estão vivendo uma nova realidade comigo! Nossas reuniões de terça feira são as melhores. Duda, Livia, Isa Penha, Isa Alves, Sofia, Janine.

Aos meus amigos do trabalho, que passam a maior parte do meu tempo comigo, obrigada por toda ajuda, ensinamentos, crescimento. Vocês estão me ajudando a ser melhor.

## RESUMO

COSTA, B.K. **Análise esteroidogênica de membrana corioalantóide de equídeos** 2024. Dissertação (Mestrado em reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A esteroidogênese placentária tem a importante função de manter a homeostase gestacional e desenvolvimento dos fetos. Em equinos, essa metabolização ocorre na unidade feto-placentária, que é caracterizada pela junção de tecidos maternos e tecidos fetais. Ela é responsável pela produção e metabolização dos hormônios circulantes durante todo o período gestacional, fazendo com que insumos maternos, como colesterol, sejam metabolizados e aromatizados no tecido placentário e fetal, iniciando assim a produção esteroides. As enzimas presentes no tecido placentário direcionam a metabolização desses substratos e liberação tanto na corrente sanguínea materna quanto na circulação fetal via cordão umbilical. As principais enzimas presentes na membrana corioalantoide são 3 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase /  $\Delta$ 5-4 isomerase (3 $\beta$ HSD) e 17 $\alpha$ -hidroxylase / 17,20- lyase citocromo P450 (P450c17) que estão envolvidas na síntese de progesterona (P4) e andrógenos, e aromatase citocromo P450 (P450arom) que converte  $\Delta$ 4- androgênios em estrógenos, e a 5 $\alpha$ -redutase que é importante na sintetize de 5 $\alpha$ diidroprogesterona (DHP). A ausência de alguma dessas enzimas metabolizadoras no tecido placentário pode influenciar principalmente no desenvolvimento de um neonato saudável e viável, fazendo com que o animal tenha alterações observáveis logo após o nascimento ou durante o decorrer da vida. Os grupos foram divididos em potros equinos Mangalarga Paulista, clones vivos e clones que vieram a óbito nas primeira horas de vida e potros muares. A coleta do tecido corioalantoide foi realizada logo após o delivramento, posicionada em F para avaliação macroscópica, após foi realizado coleta de fragmentos de 1cm<sup>2</sup> que foi fixado em paraformoldeido, emblocado e os cortes histológicos submetidos a imunohistoquímica. As analises forma sob microscopia de luz quanto a presença, ausência e intensidade de imunomarcção em avaliações duplo cego. Os estudos demonstraram que não houveram diferenças significativas entre dos grupos analisados quanto a presença ou ausência da imunomarcção, demonstrando assim que apesar de diferenças de desenvolvimento, as enzimas

estudadas estão presentes no tecido corioalantoide de equinos, clones e muares de foram similar.

Palavras-chave: placenta, hormônios, progestágenos, estrógenos.

## ABSTRACT

COSTA, B.K. **Steroidogenic analysis of equine chorioallantoic membrane** 2024. Dissertation (Masters in Animal Reproduction) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2024.

Placental steroidogenesis has an important function in maintaining gestational homeostasis and fetal development. In horses, this metabolism occurs in the fetoplacental unit, which is specific to maternal and fetal tissues. It is responsible for the production and metabolization of circulating hormones throughout the gestational period, causing maternal inputs, such as cholesterol, to be metabolized and aromatized in the placental and fetal tissue, thus initiating the production of steroids. The enzymes present in the placental tissue direct the metabolization of these substrates and their release both into the maternal bloodstream and into the fetal circulation via the umbilical cord. The main enzymes present in the chorioallantoic membrane are  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ -4 isomerase ( $3\beta$ HSD) and  $17\alpha$ -hydroxylase/ $17,20$ -lyase cytochrome P450 (P450c17) which are involved in the discovery of progesterone (P4) and androgens, and aromatase cytochrome P450 (P450arom) that converts  $\Delta^4$ -androgens into estrogens, and a  $5\alpha$ -reductase that is important in the synthesis of  $5\alpha$ dihydroprogesterone (DHP). The absence of some metabolizing enzymes in the placental tissue can mainly influence the development of a healthy and viable newborn, causing the animal to have observable changes shortly after birth or throughout life. The groups were divided into Mangalarga Paulista equine foals, live clones and clones that died in the first hours of life and mule foals. The chorioallantoic tissue was collected shortly after birth, positioned in F for macroscopic evaluation, after collecting  $1\text{cm}^2$  fragments that were fixed in paraformoldehyde, blocked and the histological sections were subjected to immunohistochemistry. The chorioallantoic tissue was collected immediately after delivery, positioned in F for macroscopic evaluation, after which  $1\text{cm}^2$  fragments were collected, which were fixed in paraformoldide, blocked and the histological sections were subjected to immunohistochemistry. Analyzes are carried out under light microscopy regarding the presence, absence and intensity of staining in double-blind evaluations. The studies demonstrated that there were no significant differences between the groups analyzed regarding the presence or absence of immunostaining, thus demonstrating that despite

differences in development, the enzymes studied are present in the chorioallantoic tissue of horses, clones and mules of similar.

Keywords: Placenta, hormones, progestogens, estrogens.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da esteroidogênese placentária equina demonstrando a metabolização hormonal pelas enzimas presentes no tecido corioalantóide .....	21
Figura 2 – Desenho esquemático das proteínas analisadas relacionadas a esteroidogênese placentária.....	26
Figura 3 – Classificação quanto a coloração das lâminas sendo – ausência de imunomarcacão, +- raros, + menos intenso, ++ intensidade moderada e +++ muito intenso.....	27
Figura 4 – Tecidos corioalantóides corados por técnica de imunohistoquímica representando reação e presença de imunomarcacão, respectivamente 3 $\beta$ HSD 21 $\beta$ Hidroxilase , P450c17, P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ - redutase. Microscopio Olympus BX61VS aumento 40x.....	29
Figura 5 – Classificação quanto a coloração das lâminas sendo – ausência de imunomarcacão, +- raros, + menos intenso, ++ intensidade moderada e +++ muito intenso.....	36
Figura 6 - Tecidos corioalantóides corados por técnica de imuno-histoquímica representando reação e presença de imunomarcacão das enzimas 3 $\beta$ HSD, 21 $\beta$ Hidroxilase, P450c17, P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ - redutase. Microscopio Olympus BX61VS aumento 40x. ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de presença ou ausência de imunomarcacão das lâminas analisadas de tecidos corioalantóides de potros equinos, clones vivos e clones óbito quanto aos anticorpos 3 $\beta$ HSD, 21 $\beta$ Hidroxilase, P450c17, P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -redutase .....	28
Tabela 2 - Identificação da égua, idade, raça e paridade, além da data do parto, espécie do produto e o sexo, peso da membrana corioalantóide, peso da membrana amniótica e cordão umbilical. ....	34
Tabela 3 - Classificação de presença ou ausência de imunomarcacões das lâminas analisadas de tecidos corioalantóides de potros equinos e potros muares quanto aos anticorpos 3 $\beta$ HSD, 21 $\beta$ Hidroxilase, P450c17, P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ - redutase .....	36

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	ESTEROIDOGÊNESE PLACENTÁRIA .....	17
3	HIPÓTESE.....	21
4	OBJETIVOS.....	22
5	Experimento 1: ESTEROIDOGÊNESE DE MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE POTROS EQUINOS PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO CONVENCIONAL E CLONAGEM.....	23
5.1	INTRODUÇÃO.....	23
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.2.1	ESCOLHA DOS ANIMAIS .....	25
5.2.2	COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL .....	25
5.3	RESULTADOS.....	26
5.4	DISCUSSÃO.....	28
6	Experimento 2: ESTEROIDOGÊNESE DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE POTROS EQUINOS E POTROS MUARES.....	30
6.1	INTRODUÇÃO.....	30
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
6.2.1	ESCOLHA DOS ANIMAIS .....	32
6.2.2	COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL .....	33
6.3	RESULTADOS.....	35
6.4	DISCUSSÃO.....	35
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41



## 1 INTRODUÇÃO

A placenta é a interface materno – fetal em mamíferos e tem múltiplas funções, entre elas, a troca de gases e solutos entre mãe e feto (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1977; SOUZA, 2014; WILSHER; ALLEN, 2012). O transporte de nutrientes nesta interface pode estar diretamente ligado ao ganho de peso e tamanho do potro ao nascimento, tanto quanto a alterações que podem se desenvolver na vida adulta, como por exemplo doenças metabólicas e cardiovasculares (ROSSO, 1981; GODFREY; BARKER, 2000; HAGGARTY et al., 2002).

Além da transferência de nutrientes da mãe para o feto e secreção de resíduos do feto para a mãe, a placenta atua como uma barreira facilitadora ou dificultadora para a transferência de patógenos, fatores de crescimento, citocinas e bioativos durante o período gestacional, além de ser responsável pela difusão simples de gases (COMLINE; SILVER, 1970; SILVER; COMLINE, 1975).

A placenta equina é também um tecido de alto metabolismo, capaz de modificar ácidos graxos essenciais e produzir fosfolipídeos para suprir as necessidades fetais (REGNAULT et al., 2002; STAMMERS et al., 1995). Além disso, é considerada um órgão endócrino pela sua capacidade de sintetizar e secretar vários hormônios na unidade feto-placentária (REGNAULT et al., 2002; STAMMERS et al., 1995) .

A esteroidogênese placentária tem sido amplamente estudada em equinos , muito devido a sua complexidade e diferenciação com outras espécies. Mesmo assim, continua não totalmente compreendida (GRIFFIN; GINTHER, 1992; LEGACKI et al., 2016). Assim, o principal objetivo desta dissertação é estudar a capacidade enzimática da membrana corioalantóide no momento do parto, fazendo uma análise comparativa entre diferentes biotécnicas reprodutivas (gestações produzidas por transferência de embriões x clonagem em equinos), bem como entre equídeos (gestações de fetos equinos x muare).

## 2 ESTEROIDOGÊNESE PLACENTÁRIA

A placenta é a interface materno – fetal em animais mamíferos e tem múltiplas funções, entre elas, a troca de solutos entre mãe e feto. No 40º dia ocorre uma junção entre as superfícies apicais do epitélio luminal do endométrio e o trofoblásto não invasivo do alantocórion, e durante os próximos 40 dias o alantocórion se expande lentamente até ocupar todo o lumen uterino. (WILSHER; ALLEN, 2012) Em equinos ela é caracterizada como epiteliocorial, por apresentar seis camadas de tecido entre os capilares maternos e fetais e o epitélio materno está em contato direto com o córion. Quanto a classificação como difusa, se dá pelo fato de que após 40-100 dias da ovulação há o surgimento de vilosidades distribuídas uniformemente em toda sua área, exceto nas pontas dos cornos e na estrela cervical, formando agrupamento de vilos, denominados microcotilédones, sendo essas as unidades de trocas hemotróficas (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1977; SOUZA, 2014).

A unidade feto-placentária é formada por volta do dia 40 após a fertilização, composta por gônadas, adrenais fetais e tecido corioalantóide, neste momento iniciando um contato microviloso com o epitélio endometrial. Nos próximos 100 dias, segue desenvolvendo interdigitações materno-fetais complexas com o endométrio, formando a unidade de trocas hematotróficas microcotiledonarias, que recobrem toda a superfície placentária epitélio corial difusa (MÖSTL, 1994).

Após os 60 dias de gestação, as gônadas e adrenais do feto já em desenvolvimento, juntamente com o tecido placentário, tem um papel importante na síntese e metabolismo de alguns hormônios gestacionais (ALLEN; STEWART, 2001; LEGACKI et al., 2019b). Apesar de alguns hormônios presentes serem comuns em várias espécies de mamíferos, alguns aspectos da secreção de gonadotrofinas, progestágenos e esteróides são particulares em equinos (MEIRELLES et al., 2017).

A produção de progestágenos utiliza o colesterol materno e começa por volta dos 70 dias de gestação, com a conversão em pregnenolona inicialmente produzida pela égua e depois pela adrenal fetal. Os progestágenos liberados na circulação fetal são posteriormente metabolizados pelo tecido fetal e retornam à placenta antes de serem liberados na circulação materna. Assim, a concentração de progestágenos maternos pode ser considerada uma medida do bem-estar da unidade feto-

placentária (ALLEN et al., 2002; BHAVNANI; SHORT; SOLOMON, 1969; CHAVATTE et al., 1997; PASHEN; ALLEN, 1979).

Neste início da esteroidogênese, a conversão de colesterol materno em pregnenolona, é realizada pelas enzimas membros do grupo de oxidases do subgrupo Citocromo P450, sendo mais especificamente para essa fase P450<sub>scc</sub>, que ainda estará presente na conversão de Pregnenolona em 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolona e dehydroepiandrostenediona (DHEA), progesterona em 17 $\alpha$ -hydroxy progesterona e androstenediona, sendo evidente nessas transformações a P450<sub>c17</sub>. Enquanto para a metabolização de Progesterona em Deoxy-corticosterona e 17 $\alpha$ -ydroxy progesterona em 1-deoxycortisol encontramos a presença da enzima P450<sub>c21</sub> (BATISTA, 2004).

LEGACKI et al., 2017 relata que a abundância na transcrição de CYP17A1, o gene que codifica P450<sub>c17</sub>, é extremamente baixa na placenta em comparação com gônadas fetais e glândulas adrenais. Demonstrando que as gônadas fetais são provavelmente também uma fonte significativa das altas concentrações de pregnenolona observadas na circulação fetal.

Além disso, com base em altas concentrações de pregnenolona liberadas através da artéria umbilical e concentrações marcadamente mais baixas na veia umbilical, acredita-se que a placenta utilize essa substância derivada do feto para a síntese de pregnano pela 5 $\alpha$  redutase, sendo este, componente da classe já citado P450, mais especificamente P450<sub>arom</sub> (OUSEY et al., 2003a).

A progesterona e os progestágenos são necessários para manter a quiescência miometrial durante a gestação. O aumento nos níveis de progestágenos próximo ao parto está relacionado com o aumento da atividade das gônadas fetais, promovendo secreção e desenvolvimento da glândula mamária. Entretanto, para que o parto possa ocorrer, os níveis de progesterona decaem, concomitante com uma maior produção de cortisol pelas gônadas fetais (FOWDEN; LI; FORHEAD, 1998; SILVER; FOWDEN, 1994).

Estudos ainda indicam que há uma perda seletiva de atividade da 5 $\alpha$  redutase nas placentas pós parto comparadas com placentas aos 300 dias de gestação, por isso há um declínio da mesma pré parto. Essa inibição está associada ao aumento de progesterona encontrado na circulação materna e fetal, sugerindo que a própria síntese placentária de pregnanos deva diminuir (BATISTA, 2004; LEGACKI et al., 2018; WYNN et al., 2018).

Embora se acredite que alguns dos 5 $\alpha$ -pregnanos tenham atividade progestágena, eles também podem ser considerados produtos da biossíntese placentária e podem controlar a formação de progesterona por meio de uma regulação de feedback (CHAVATTE; ROSSDALE; TAIT, 1995; DAVIES; KENNETH; RYAN, 1972; LEGACKI et al., 2018)

Os esteróides de reação cruzada foram identificados como metabólitos de progesterona 5 $\alpha$ -redutase incluindo 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona (5 $\alpha$ -DHP), presente principalmente da metade até o final da gestação mais especificamente 20 a 30 dias antes do parto, e apresentam uma queda acentuada nas últimas 24 a 48 horas pré parto (HOLTAN; NETT; ESTERGREEN, 1975; OUSEY et al., 2003b). Entre os múltiplos gestações com 5 $\alpha$ -redutase, presume-se que o 5 $\alpha$ -DHP seja o mais fisiologicamente relevante em estudos usando o endométrio uterino de éguas e a glândula mamária, já descrito também por estimular o desenvolvimento de glândulas endometriais (CHAVATTE-PALMER et al., 2000; STANLEY R. GLASSER, 1929).

Assim como a unidade fetoplacentária tem um papel importante na produção de progestágenos, a placenta equina isoladamente, é incapaz de produzir todos os estrógenos necessários para a manutenção da prenhez até o termo. Ocorrendo então a liberação de substratos pelas gônadas e adrenais fetais, que são metabolizados por enzimas presentes na membrana corioalantóide e liberadas tanto na circulação materna, quanto na circulação umbilical para suprir as necessidades fetais. (DAVIES; KENNETH; RYAN, 1972; LEGACKI et al., 2019b; SHORT RV, 1959).

A síntese de esteróides na gestação equina, já foi descrita como mais semelhante à dos primatas e humanos, devido a alta presença do andrógeno Desidroepiandrosterona (DHEA) que é sintetizado em tecidos fetais não placentários, e é transportado para a placenta, para serem convertidos em estrogênios (CONLEY, 2016; BERKANE et al., 2017; LEGACKI et al., 2019b)(Imagem 1).

A placenta equina tem uma capacidade pronunciada para o metabolismo de esteróides pela expressão das atividades 5 $\alpha$ -redutase, 3 $\beta$ HSD e aromatase, mas tem pouca capacidade para a síntese de andrógenos, sem atividade significativa de P450c17. O parto está associado a uma perda seletiva da atividade da 5 $\alpha$ -redutase e da abundância de transcritos, sem quaisquer alterações na 3 $\beta$ HSD ou na aromatase. A perda da atividade e expressão da 5 $\alpha$ -redutase placentária é consistente com o declínio dramático nos metabólitos 5 $\alpha$ -redutase pregnane que ocorre nos dias

anteriores ao parto e provavelmente contribui substancialmente para isso (LEGACKI et al., 2018).

A conversão de pregnenolona em progesterona pelo  $3\beta$ -HSD é um passo crucial na síntese da maioria dos hormônios esteróides, a placenta pode utilizar DHEA, produzida em grande quantidade pelas gônadas fetais, em virtude da  $3\beta$ -HSD para sua conversão em esteróides. As concentrações desses hormônios se mantem alta e decaem 2 a 3 meses antes do parto, concomitantemente com a fase de regressão das gônadas fetais (PASHEN; ALLEN, 1979).

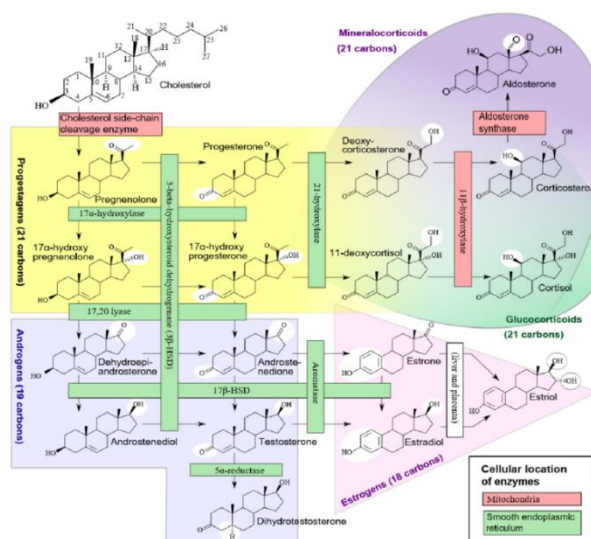
Estudos anteriores indicam a relação da produção de estrógenos no fornecimento de sangue e nutrientes para o desenvolvimento da gestação e para o nascimento do feto, pois a prostaglandina, juntamente com o  $17\beta$ -estradiol agem no fluxo sanguíneo e na contratilidade miometrial, afetando o transporte de nutrientes e oxigênio pela placenta (PASHEN; ALLEN, 1979).

Próximo ao parto ocorre o processo de maturação da glândula adrenal fetal que desencadeia uma diferente síntese hormonal pela glândula: de pregnolona para cortisol (FOWDEN; FORHEAD; OUSEY, 2008).

As concentrações de cortisol fetal também aumentam tardiamente na gestação de equinos em comparação com outras espécies. A cascata endócrina pré-parto parece começar nos equinos com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) fetal, mas, inicialmente, o principal produto da adrenal fetal equina parece ser a pregnenolona (P5) e não o cortisol. Isso leva ao aumento da produção de progestágenos pelos tecidos uteroplacentários, o que mantém a quiescência uterina em face do aumento do estiramento uterino causado pelo rápido crescimento do feto. Muito próximo ao termo, em associação com o aumento dos níveis fetais de ACTH, as adrenais fetais equinas parecem passar a produzir cortisol. Esse pico tardio de cortisol induz a um período de rápida maturação fetal e também pode contribuir para o aumento da produção uteroplacentária de  $17\beta$ -estradiol e prostaglandinas (FOWDEN; FORHEAD; OUSEY, 2008).

A queda na disponibilidade de pregnenolona pode reduzir a produção uteroplacentária de progestágenos e eliminar o bloqueio da contratilidade miometrial. Por fim, o aumento da secreção de prostaglandinas ativa as contrações miometriais, que estimulam a liberação de ocitocina por meio de um reflexo neuroendócrino resultando no parto (FOWDEN; FORHEAD; OUSEY, 2008).

Figura 1: Desenho esquemático da esteroidogênese placentária equina demonstrando a metabolização hormonal pelas enzimas presentes no tecido corioalantóide .



Fonte: Imagen por Lecturio.

### 3 HIPÓTESE

**Experimento 1:** Espera-se que haja alterações na presença e quantidade de enzimas necessárias para metabolização hormonal responsável pela homeostase gestacional, sendo em menor quantidade em clones por conta de alterações gestacionais e neonatais relatadas na literatura.

**Experimento 2:** Espera-se que haja diferença na presença de enzimas no tecido corioalantóide entre muares e equinos devido a diferença na formação dos cálices endometriais e corpos luteos acessórios e secundários em gestações de potros híbridos.

#### 4 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo analisar de forma comparativa membranas corioalantóide após delivramento imediato quanto a presença ou não das enzimas necessária para realização da cascata hormonal da esteroidogênese placentária.

Experimento 1. Análise comparativa da esteroidogênese de membrana corioalantoide de gestações a termo de potros equinos produzidos por meio de transferência de embrião convencional e potros equinos produzidos por meio de transferência nuclear de células somáticas, sendo esses, três grupos: Potros controle, potros clones vivos e potros clones que vieram a óbito.

Experimento 2. Análise comparativa da esteroidogênese de membranas corioalantóides de gestações a termo de potros equinos e potros muare.

## 5 EXPERIMENTO 1.

### ESTEROIDOGÊNESE DE MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE POTROS EQUINOS PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO CONVENCIONAL E DE CLONAGEM

#### 5.1 INTRODUÇÃO

A reprodução equina busca melhorar a cada dia sua eficácia, produzindo potros em maior número e melhor qualidade, para isso são usadas várias técnicas artificiais para obter estes animais, como inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferência de oócito (TO), superovulação em éguas, biotecnologias aplicadas à melhoramento de sêmen e a clonagem (ROSER; MEYERSBROWN, 2019).

Em equinos, a clonagem tem sido um meio capaz de recuperar indivíduos subfêrteis para a reprodução, animais de alto valor econômico, zootécnico e sentimental ou até que já vieram a óbito. Isso se torna possível, uma vez que a transferência nuclear de células somáticas (SCNT) produz potros geneticamente idênticos ao animal doador.

Em 2003 foram relatados os primeiros clones equídeos nascidos, gerados a partir de fibroblastos fetais, resultando em três mulas (WOODS et al., 2003). No mesmo ano, houve o relato do nascimento de um clone equino usando o método de transferência de fibroblastos adultos para um oócito enucleado (GALLI et al., 2003). Desde então, a técnica vem se aprimorando e se tornando viável para muitos criadores, no entanto, apesar de relativo sucesso, os produtos podem apresentar anormalidades neonatais.

As perdas relacionadas a clonagem podem ser observadas em períodos de pré /pós-implantação e perinatal. Alguns dos fatores que influenciam essas perdas são traumas durante a micromanipulação, incompetência oocitária, anomalias induzidas pelo cultivo in vitro e falha na reprogramação epigênica do núcleo doador. Desta forma, a taxa de sucesso para essa técnica pode variar de 9% (OLIVERA et al., 2016) a 24% (CHOI et al., 2015).

Na espécie bovina foi observado que uma alta taxa de perda está relacionada a SCNT, a maior parte ocorre entre os 30 a 90 dias de gestação decorrente da menor



quantidade de placentônios na membrana corioalantóide. Quando não há perda, algumas alterações são observadas como, edema de membranas fetais, grande acúmulo de fluido alantóide, comprometimento do desenvolvimento alantóico e vascularização subdesenvolvida do saco alantóide, anormalidades na placentação e crescimento excessivo dos fetos causando distocias, fraqueza, envelhecimento prematuro dos animais clonados (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; LEE et al., 2004). Também já foram observadas alterações em outros animais como porcos, ovelhas e camundongos, resultando em modificações epigenéticas inadequadas dos principais genes reguladores e para o desenvolvimento placentário, colaborando para que alguns países não compactuem com a execução desta técnica, colocando em risco o bem estar animal (CAMPBELL, 2018).

Devido a essas perdas e anomalias já relatadas, o estudo atual tem como objetivo localizar as enzimas metabolizadoras de hormônios que mantêm a homeostase gestacional e desenvolvimento fetal na membrana corioalantóide, comparando com potros equinos que foram gerados a partir de transferência de embrião convencional. Além disso, procurou-se incluir um grupo de gestações produzidas por meio de SCNT onde os neonatos não foram viáveis ao nascimento, com objetivo de verificar se as alterações encontradas são exacerbadas neste grupo.

Levanta-se a hipótese de que devido a alterações placentárias relatadas quanto a técnica de transferência nuclear de células somáticas, possa haver alterações das enzimas esteroidogênicas presentes no tecido corioalantoide levando a consequências nos hormônios gestacionais.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA FMVZ – USP) e seu desenvolvimento ocorreu de acordo com as diretrizes da mesma, sob protocolo 3477230720.

### 5.2.1 ESCOLHA DE ANIMAIS

Foram acompanhados por equipe de médicos veterinários os partos de 15 éguas no total, sendo 10 éguas gestantes de embriões provenientes da transferência

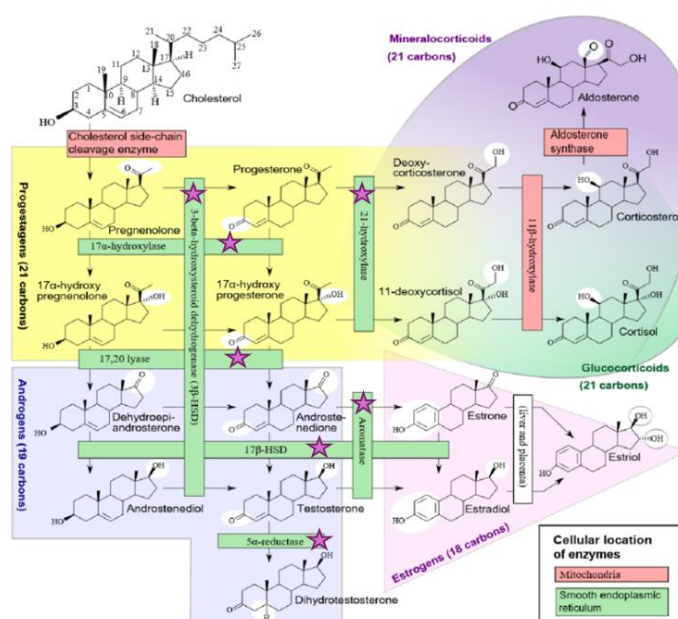
nuclear de células somáticas, sendo estes de diferentes doadores, e 5 éguas de embriões decorrentes de transferência de embrião convencional. As éguas gestantes de clones equinos foram alojadas na empresa InVitro Clonagem Animal, localizada na cidade de Mogi-Mirim, estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 22°25'54" sul; Longitude: 46°57'28" oeste; Altitude: 631 metros). As éguas com gestações de animais convencionais estavam instaladas na Fazenda Santa Rita II, localizada em Piracaia, no estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 23°03'14" sul; Longitude: 46°21'29" oeste; Altitude: 792 metros). Ambos os grupos experimentais foram equinos, fêmeas, pesando entre 350 a 550kg, com idade entre 5 a 15 anos. Dispõe de iluminação natural, alimentação à pasto de Tifton e ração, com fonte de água natural ad libitum.

### 5.2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Para a análise esteroidogênica pela técnica de imunohistoquímica, as amostras de tecido corioalantóide foram coletadas logo após o parto. As membranas fetais foram recolhidas e avaliadas macroscopicamente quanto ao aspecto, integridade, coloração, e mensuração o peso total da membrana corioalantoide. A mesma foi fotografada na disposição convencional formando a letra "F"(ALLEN; WILSHER, 2009b; POZOR, 2015; VERONESI et al., 2010), em seguida foram coletados fragmentos de 1cm<sup>2</sup> tecido da membrana corioalantoide, nas regiões do corpo uterino (CP), corno gravídico (CG) e corno não gravídico (CnG). Essas amostras coletadas foram imediatamente fixadas em solução de álcool metílico (TOLOSA et al., 2003). Em seguida realizamos a desidratação seriada em soluções alcólicas com concentrações crescentes (50 até 100%), diafanizamos em xilol e posteriormente feita a inclusão em parafina (TOLOSA et al., 2003). Obtivemos cortes com 5 µm de espessura em micrótomo Leica RM2165 e a montagem foi realizada nas lâminas silanizadas (Starfrost White, Sakura, ready to use, Germany – Dako 9545-1). A próxima etapa foi desparafinizar os cortes desidratados, e então foi realizada a exposição dos epítomos por fervura em tampão citrato em panela de pressão elétrica, durante 5 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi extinta com peróxido de hidrogênio a 3% em câmara escura por 20 minutos e em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas com Protein block (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). As amostras foram incubadas por 30 minutos com anticorpo policlonal primário, para receptores de estrógenos, enzimas 3β-hidroxiesteróide desidrogenase / Δ5-4

isomerase (3 $\beta$ HSD) (Abcam, Cambridge, MA,EUA -ab65156) , 21 beta hidroxilase esteroidal (21  $\beta$  Hidroxilase) (Abcam Cambridge, MA,EUA -ab232809), 17 alfa-hidroxilase/ 17 $\alpha$ -hidroxilase / 17,20- liase citocromo P450 (P450c17) (Abcam Cambridge, MA,EUA -ab231794), Citocromo P450 aromatase (P450arom) (Abcam Cambridge, MA,EUA -ab18885) , 17 beta- hidroxisteroide desiidrogenase (17 $\beta$ -HSD) (Abcam Cambridge, MA,EUA -ab238900), 5-alfa-redutase (5aredutase) (Abcam Cambridge, MA,EUA -ab110123) (CONLEY; BALL, 2019; LEGACKI et al., 2017b; NETO et al., 2010) (Figura 2). Para controle negativo, foi utilizado peptídeo sintético de bloqueio, previamente produzido pela empresa (RHEABIOTECH, Campinas, SP, Brasil). A imunorreatividade foi detectada usando anticorpo secundário biotilado Impress® Universal Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Em seguida, as amostras foram lavadas em solução tampão fosfato e reveladas com IMPACT® DAB (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas com cola e lamínulas para observação e foto documentação em microscópio Olympus BX61VS, escaneados pelo Software VS-ASW, e então após a finalização da coleta de dados foi feita a análise estatística dos resultados. As lâminas foram analisadas também em microscópio de luz quanto a presença ou ausência da reação dos anticorpos e intensidade sendo classificadas com cruces e realizado teste duplo cego e média simples.

Figura 2 – Desenho esquemático das proteínas analisadas relacionadas a esteroidogênese placentária

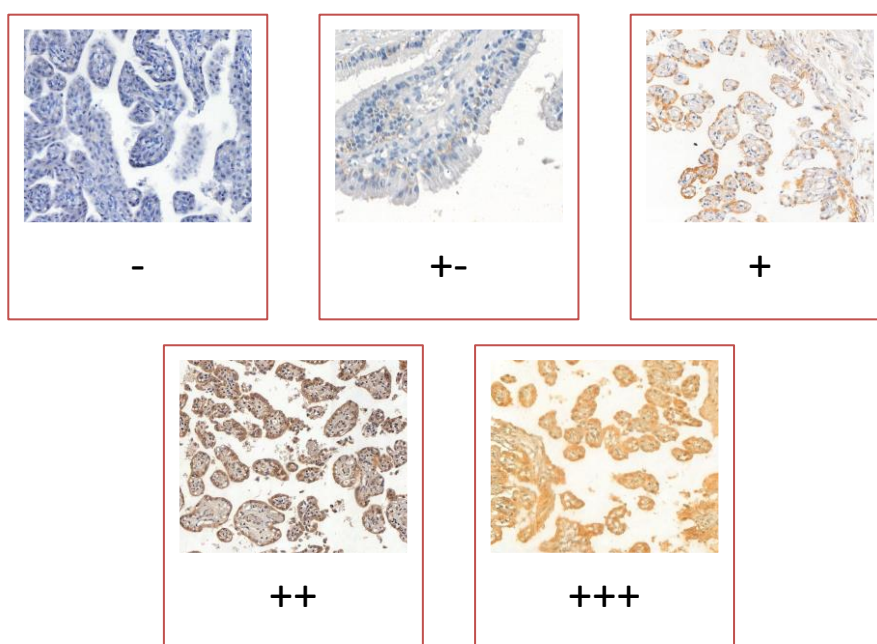


Fonte: Imagem por Lecturio (modificada)

### 5.3 RESULTADOS

Em microscopia, as lâminas foram analisadas quanto a presença ou não de imunomarcção e intensidade, sendo – ausência de imunomarcção, +- raros, + menos intenso, ++ intensidade moderada e +++ muito intenso (figura 3). Organizada em tabelas para comparação entre os grupos (tabela 1).

Figura 3 – Classificação quanto a coloração das lâminas sendo – ausência de imunomarcção, +- raros, + menos intenso, ++ intensidade moderada e +++ muito intenso



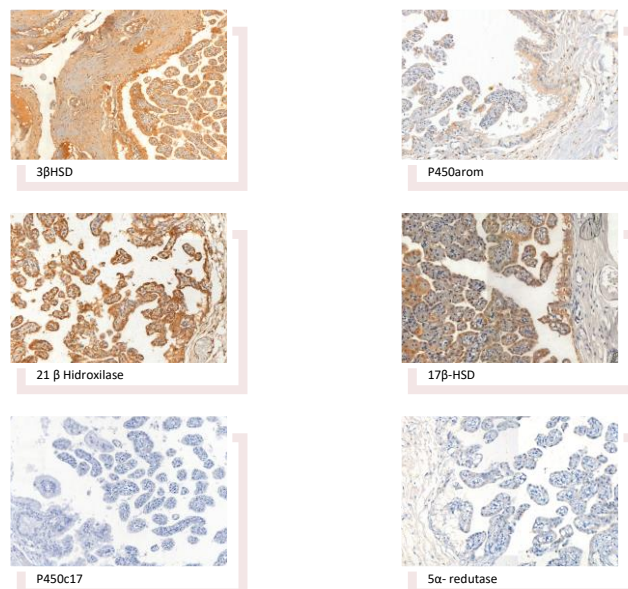
Fonte: Acervo pessoal

Tabela 1 – Classificação de presença ou ausência de imunomarcção das lâminas analisadas de tecidos corioalantóides de potros equinos, clones vivos e clones óbito quanto aos anticorpos 3 $\beta$ HSD, 21  $\beta$  Hidroxilase, P450c17, P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ - redutase

3 $\beta$ HSD			P450c17			5 $\alpha$ -redutase		
	CP	CG		CP	CG		CP	CG
Grupo Controle			Grupo Controle			Grupo Controle		
Mariana	++	+++	Mariana	+-	+-	Mariana	+-	+-
Grécia	+++	+++	Grécia	-	+-	Grécia	-	-
Riviera	++	++	Riviera	-	-	Riviera	+-	+-
Isadora	++	++	Isadora	-	-	Isadora	+-	+-
Clones vivos			Clones vivos			Clones vivos		
Vd18	+	+	Vd18	-	+-	Vd18	+-	+-
p054	++	+	p054	-	-	p054	+-	+-
852	+++	+++	852	+-	-	852	+-	+
262	+++	++	262	+-	-	262	+	+
Clones Óbito			Clones Óbito			Clones Óbito		
69	++	++	69	+	+	69	+	+
08f	+++	+++	08f	+-	+	08f	-	+-
897	++	++	897	-	-	897	-	-
Baia	+++	+++	Baia	+-	+-	Baia	+-	+-
P450c21			P450arom			17 $\beta$ HSD		
	CP	CG		CP	CG		CP	CG
Grupo Controle			Grupo Controle			Grupo Controle		
Mariana	+	++	Mariana	-	+-	Mariana	++	+++
Grécia	+	++	Grécia	+-	-	Grécia	+++	+++
Riviera	++	++	Riviera	-	+-	Riviera	+	++
Isadora	++	++	Isadora	+-	-	Isadora	++	++
Clones vivos			Clones vivos			Clones vivos		
Vd18	+	+	Vd18	+-	-	Vd18	++	++
p054	++	+	p054	+-	-	p054	++	++
852	++	+++	852	+	++	852	++	+++
262	++	+++	262	+	++	262	+++	++
Clones Óbito			Clones Óbito			Clones Óbito		
69	++	+	69	-	+-	69	+++	++
08f	++	+++	08f	-	+	08f	++	++
897	++	+	897	+-	-	897	+++	+++
Baia	+++		Baia	+	+-	Baia	+++	+

As proteínas se encontram em locais específicos em cada anticorpo, sendo: 3 $\beta$ HSD (figura 2A) foi localizada no reticulo endoplasmático, 21  $\beta$  Hidroxilase (figura 2B) no retículo endoplasmático, P450c17(figura 2C) é encontrado na membrana celular, P450arom (figura 2D) membrana celular, 17 $\beta$ -HSD (figura 2E) membrana celular enquanto 5 $\alpha$ -redutase (figura 2F) está presente no microsossoma e retículo endoplasmático celular, porém devido ao aumento usado na microscopia analisada, todas as proteínas acima aparecem coradas em região de citoplasma.

Figura 4 – Tecidos corioalantóides corados por técnica de imunohistoquímica representando reação e presença de imunomarcação, respectivamente 3 $\beta$ HSD 21  $\beta$  Hidroxilase (B), P450c17 (C), P450arom (D), 17 $\beta$ -HSD (E), 5 $\alpha$ - redutase (F). Microscopio Olympus BX61VS aumento 40x.



Fonte: Acervo pessoal

#### 5.4 DISCUSSÃO

O estudo da esteroidogênese placentária foi realizado com grupos de potros nascidos de transferência de embriões convencionais, sendo esses Mangalarga Paulista, potros clones que vieram a óbito logo após nascimento ou natimortos e potros clones que se mantiveram vivos durante o período de estudo.

Os grupos foram analisados quanto a presença de enzimas responsáveis pela esteroidogênese placentária, sendo essa, responsável pela homeostase gestacional.

Já foram descritos, alterações físicas e morfológicas tanto na membrana corioalantóide como nos neonatos. Em clones bovinos por meio da SCNT foram relatadas alterações como síndrome da prole gigante, observada no final da gestação, aumentando o número de perdas gestacionais devido ao tamanho excessivo do feto e desenvolvimento anormal da placenta (FARIN; FARIN, 1995; HILL *et al.*, 1999). Em equinos, edema placentário e vasos ingurgitados já foram descritos por POZOR *et al.*, 2016 porém não há descrição da correlação entre as alterações morfológicas e alterações na esteroidogênese placentária de clones equinos, mas já é sabido que a supressão na síntese de estrógenos no final da gestação pode estar ligadas a falha de transporte de oxigênio e nutrientes pela placenta devido a rede vascular

prejudicada da placenta (LOUX *et al.*, 2020; PASHEN; ALLEN, 1979) a supressão da síntese de estrógenos no último trimestre da gestação, resultou em diminuição do peso neonatal e da proporção do peso feto-égua como relatado por (ESTELLER-VICO *et al.*, 2017)

As membranas corioalantóides foram coletadas logo após o delivramento, contendo assim as enzimas presentes no termo gestacional. Chavatte e colaboradores, descreveram a presença de  $3\beta$ HSD durante o final da gestação, (CHAVATTE *et al.*, 1997) podendo estar presente em alta intensidade devido a alta atividade e não exclusivamente em quantidade.

Os altos níveis de  $3\beta$ HSD na placenta se justificam pelo fato de que para o DHEA, precursor dos andrógenos, ser detectável na circulação, ele deve primeiro passar por uma oxidação convertendo-se em androstenediona, para que a aromatização seja possível, o que condiz com o alto nível de  $3\beta$ HSD no alantocório (LEGACKI *et al.*, 2018, 2019a) similarmente, o presente trabalho que demonstra que as membranas de todos os grupos apresentaram marcação indicativa da presença de da enzima  $3\beta$ HSD no tecido após delivramento em alta intensidade, com pequena oscilação entre os grupos ou regiões coletadas.

A P450c17 já foi relatada com baixa expressão nos tecidos placentários, pois ela se encontra e tem mais atividade em gônadas e adrenais fetais (LEGACKI *et al.*, 2019a), sendo compatível com o resultado obtido no estudo que demonstrou marcação não tão expressiva, estando grande parte das amostras analisadas não presentes, independentemente da localização ou do grupo.

No presente estudo, observamos que a enzima  $5\alpha$ -redutase apresentou raros pontos de imunomarcção em todos os grupos, sendo assim, semelhante a análises realizadas por BATISTA, 2004; LEGACKI *et al.*, 2018; WYNN *et al.*, 2018 que referem uma perda seletiva da atividade da enzima nas placentas pós parto comparadas a placentas aos 300 dias de gestação, demonstrando assim esse declínio com a proximidade do parto.

A P450c21 está relacionada a conversão de colesterol em precursores de cortisol, sendo esse de suma importância na proximidade do parto (BATISTA, 2004), e foi demonstrada aqui em imunomarcção de moderada a alta intensidade em todos os grupos estudados, sem muitas variações. Os produtos dessa transformação, são novamente metabolizados pela enzima  $11\beta$ hidroxilyase sendo convertidos assim em cortisol, responsável pela maturação pulmonar, liberação de surfactantes, entre outros

processos para que ocorra o parto (BARNES; COMLINE; SILVER, 1978; CLYMAN et al., 1981; LIGGINS, 1976)..

Estudos prévios relatam atividade de P450arom até próximo do parto no tecido corioalantóide, (LEGACKI et al., 2018), apresentando declínio após o oitavo mês de gestação até atingirem valores basais próximos ao parto (COX, 1975; PASHEN, 1984; PASHEN; ALLEN, 1979), justificando a marcação da mesma, observada em raros focos, com mais presença no grupo de clones vivos, indicando a possibilidade de uma maior atividade nesse grupo, já que a mesma está ligada a endocrinologia fetal, contratilidade uterina e eutocia.

A 17 $\beta$ HSD é a enzima presente na conversão de DHEA em androstenetiona, já descrita em níveis altos no corioalantóide durante toda a gestação (LOUX et al., 2020), apresentando similaridade com os dados encontrados durante este estudo, apresentando uma marcação intensa em todos os grupos.

Concluimos que não houve diferença entre os grupos quanto a presença ou ausência das enzimas, também estando similares a estudos realizados anteriormente quanto a atividade das mesmas em tecido corioalantóide de equinos, porém o estudo foi realizado com um número pequeno de animais, necessitando de mais estudos.

## **6 EXPERIMENTO 2: ESTEROIDOGENESE DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE A TERMO DE GESTAÇÕES DE POTROS EQUINOS E POTROS MUARES**

### **6.1 INTRODUÇÃO**

Na reprodução animal é sabido que para se obter o nascimento de um concepto saudável é necessário que ocorra o desenvolvimento adequado de todos os tecidos placentários durante a gestação (WILSHER; ALLEN, 2012). A placenta é um importante e complexo órgão transitório. Nos equídeos ela é composta por membrana corioalantóide, membrana amniótica e cordão umbilical. Estes são responsáveis por nutrir, excretar e produzir hormônios gestacionais (ALLEN; WILSHER, 2009a). Entretanto, pouco se sabe sobre as placentas dos híbridos muares, quanto a seu perfil esteroidogênico e seus mecanismos de adaptação anatomofuncionais reprodutivos, que implicam diretamente no sucesso da gestação e que podem levar a prejuízos econômicos para os criadores.



Os fenômenos da fisiologia da gestação dos equídeos, são resultantes de complexos eventos endócrino hormonais seriados. E tem como principal conjunto de hormônios esteroides gestacionais os progestágenos, andrógenos e estrógenos (CONLEY, 2016). Estes são sintetizados, metabolizados e secretados pelos ovários maternos, placenta, gônadas e adrenais fetais. Promovendo o desenvolvimento intrauterino e realizando a manutenção da gestação até o momento do parto (LEGACKI et al., 2017a).

Antes da formação da unidade fetoplacentária há a formação da cinta coriônica aos 25-35 dias de gestação, constituída por células trofoblásticas binucleadas que invadem o endométrio materno formando os cálices endometriais. Estes são responsáveis pela secreção de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) que atinge a circulação materna por meio de vasos linfáticos formados no estroma abaixo de cada cálice sendo presentes até meados de 120 dias de gestação, após este período, ocorre sua degeneração enquanto a unidade feto-placentária assume a produção hormonal até o fim da gestação (ALLEN; WILSHER, 2009; ANTCZAK et al., 2013; MURPHY; MARTINUK, 1991). Segundo Antczak et al., 2013 a ação do eCG é semelhante ao hormônio luteinizante (LH), estimulando o desenvolvimento dos corpos lúteos suplementares, que persistem nos ovários de 40 a 150 dias da gestação para a manutenção de progesterona (P4). Os corpos lúteos (CL) suplementares são compostos pelos CL acessórios, que são decorrentes de folículos anovulatórios e CL secundários, que derivam de alguns folículos que foram ovulados.

Nas gestações de cavalos, jumentos e mulas, imediatamente após formação dos cálices endometriais, surge uma resposta inflamatória materna devido aos antígenos paternos, que levam a expressão de MHC de classe I ou complexo de histocompatibilidade (ADAMS; ANTCZAK, 2001). Atraindo numerosos linfócitos que se aglomeram na periferia dos cálices endometriais. Esses complexos mecanismos imunorregulatórios resultam em uma barreira primária na unidade fetoplacentária (NORONHA; ANTCZAK, 2010). O genótipo fetal e o ambiente uterino do conceito híbrido também influenciam no desenvolvimento dos cálices, produção e secreção de eCG (ALLEN, 1969), podendo se observar nas gestações de potros e híbridos bardotos, maiores interações no momento da invasão do trofoblasto no endométrio, do que em gestações de jumentos e híbridos muares (ALLEN et al., 1993).

Os híbridos muares possuem um período menor de secreção, devido a antecipação da destruição dos cálices endometriais, a partir do 50º ao 80º dia,

resultante da resposta inflamatória exacerbada nas suas gestações. Resultados anteriores demonstram que o desenvolvimento da cinta coriônica parece ser governado pelo genótipo paterno, e que o útero da égua parece interferir negativamente no desenvolvimento do concepto com genótipo parte asinino. Ou seja, o desenvolvimento da cinta coriônica e a sua invasão do endométrio podem ser afetados tanto pelo genótipo fetal, quanto pelo ambiente uterino materno (ALLEN, 1969; ALLEN et al., 1993). Acreditasse que embora as taxas de concepção dos híbridos muares sejam boas, os índices de perdas gestacionais até o primeiro trimestre podem ser devido a menor produção de eCG, impedindo a formação de novos corpos lúteos acessórios (CANISSO et al., 2019).

Ao avaliar o eCG entre a 6,5 a 13<sup>o</sup> semana e a progesterona entre a 9 a 17<sup>o</sup> semana, observou que as concentrações nos híbridos muares de eCG e de progesterona são menores do que as concentrações das gestações de equinos. Essas diferenças nos padrões hormonais precoces da gestação de muares, pode se refletir nos períodos mais tardios devido a influência do eCG na hiperplasia das gônadas fetais que estão diretamente relacionadas a unidade fetoplacentaria e produção hormonal durante a gestação (BOETA; ZARCO, 2012).

O estudo tem como objetivo analisar e comparar o perfil esteroidogênico das membranas corioalantóides à termo de éguas gestantes de produtos muares versus produtos equinos. Buscando entender como ocorre a síntese de hormônios esteroides durante a gestação interespecies.

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 ESCOLHA DOS ANIMAIS

Nesse presente estudo foi coletado amostras da membrana corioalantóide de (n=8) gestações de éguas à termo, destas, 4 éguas estavam gestantes de produtos muares e 4 éguas gestantes de produtos equinos, todas as matrizes eram raça Mangalarga e foram homogeneizadas por idade e paridade, e os dados do produto, como espécie, sexo, e peso de seus anexos fetais também foram coletados. Os machos equinos eram raça Mangalarga e os asininos eram Jumento Nacional (Tabela 2).

Todos animais eram pertencentes ao Haras RAA- Fazenda Santa Rita II, localizada no município de Piracaia (Latitude: 23°03'14" sul; Longitude: 46°21'29" oeste) no estado de São Paulo- Brasil. O projeto foi aprovado pela CEUA, FMVZ - USP nº 2649170519 (ID 006852).

Tabela 2 – Identificação da égua, raça, número de partos e sua idade. Além da data do parto, espécie do produto e o sexo, peso da membrana corioalantóide, peso do âmnio e cordão umbilical.

Nota: As éguas foram separadas seguindo suas gestações, 4 éguas gestantes produtos equinos e 4 éguas gestantes de produto muar.

ML: Mangalarga

Identificação da égua	Raça	Número de partos	Idade (anos)	Data do parto	Espécie do produto	Sexo do produto	Peso da membrana corioalantóide (kg)	Peso do âmnio e cordão umbilical (kg)	Peso total dos anexos placentários (kg)
Fronteira	ML	5	13	10/09/2019	Equino	Macho	2,400	2,900	5,300
Isadora	ML	4	11	07/12/2019	Equino	Fêmea	3,600	0,900	4,500
Madrid	ML	2	7	03/11/2019	Equino	Macho	3,200	1,100	4,300
Mariane	ML	3	8	26/12/2019	Equino	Macho	3,500	2,500	6,000
Esfinge	ML	5	12	17/12/2019	Muar	Fêmea	2,300	1,400	3,700
Floresta	ML	3	10	21/08/2019	Muar	Fêmea	3,200	1,400	3,600
Grécia	ML	2	12	23/12/2019	Muar	Fêmea	2,400	1,300	3,700
Mariana	ML	2	7	12/12/2019	Muar	Fêmea	2,900	1,700	4,600

## 6.2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os partos foram acompanhados e imediatamente após o delivramento as membranas fetais foram recolhidas e avaliadas macroscopicamente quanto ao aspecto, integridade, coloração, e mensurado o peso total da membrana corioalantóide. A mesma foi fotografada na disposição convencional formando a letra "F" (ALLEN; WILSHER, 2009b; POZOR, 2015; VERONESI et al., 2010), em seguida foram coletados fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> tecido da membrana corioalantóide, nas regiões

do corpo uterino (CP), corno gravídico (CG) e corno não gravídico (CnG). Essas amostras coletadas foram imediatamente fixadas em solução de álcool metílico (TOLOSA et al., 2003).

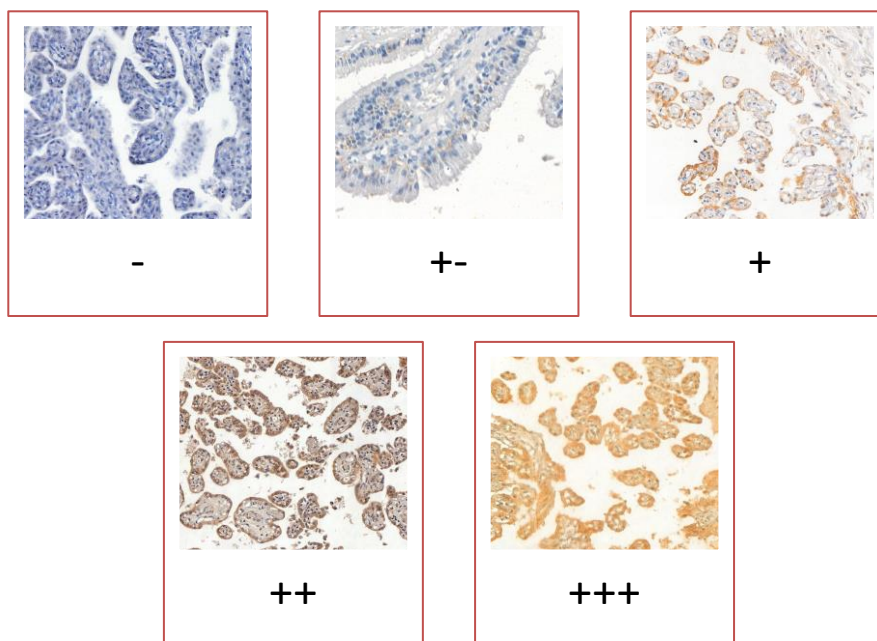
Para a análise esteroidogênica da membrana corioalantóide, pela técnica de imuno-histoquímica as amostras de tecido corioalantóide foram previamente coletadas, armazenadas e refrigeradas. Em seguida realizada a desidratação seriada em soluções alcólicas com concentrações crescentes (50 até 100%), diafanizadas em xilol e posteriormente feita a inclusão em parafina (TOLOSA et al., 2003). Obteve-se cortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo Leica RM2165 e foi realizada a montagem nas lâminas silanizadas. A próxima etapa foi desparafinizar os cortes desidratados, e então foi realizada a exposição dos epítomos por fervura em tampão citrato em panela de pressão elétrica, durante 5 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi extinta com peróxido de hidrogênio a 3% em câmara escura por 20 minutos e em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas com Protein block (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). As amostras foram incubadas por 30 minutos com anticorpo policlonal primário, para receptores de estrógenos, enzimas. As amostras foram incubadas por 30 minutos com anticorpo policlonal primário, para receptores de estrógenos, enzimas 3 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase /  $\Delta^5$ -4 isomerase (3 $\beta$ HSD) (Abcam, Cambridge, MA, EUA -ab65156) , 21 beta hidroxilase esteroidal (21  $\beta$  Hidroxilase) (Abcam Cambridge, MA, EUA -ab232809), 17 alfa- hidroxilase/ 17 $\alpha$ hidroxilase / 17,20-liase citocromo P450 (P450c17) (Abcam Cambridge, MA, EUA - ab231794), Citocromo P450 aromatase (P450arom) (Abcam Cambridge, MA, EUA - ab18885) , 17 beta- hidroxisteroide desiidrogenase (17 $\beta$ -HSD) (Abcam Cambridge, MA, EUA - ab238900), 5-alfa-redutase (5 $\alpha$ - redutase) (Abcam Cambridge, MA, EUA - ab110123)(CONLEY; BALL, 2019; LEGACKI et al., 2017b; NETO et al., 2010). Para controle negativo, foi utilizado peptídeo sintético de bloqueio, previamente produzido pela empresa (RHEABIOTECH, Campinas, SP, Brasil). A imunorreatividade foi detectada usando anticorpo secundário biotilado Impress® Universal Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Em seguida, as amostras foram lavadas em solução tampão fosfato e reveladas com IMPACT® DAB (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas com cola e lamínulas para observação e foto documentação em microscópio Olympus BX61VS, e então após a finalização da coleta de dados foi feita a avaliação microscopia classificando o tecido corioalantóide corado em cruzes quanto a presença, ausência

e intensidade de imunomarcção, realizado duplo cego e média simples para confirmação das imunomarcções obtidas.

### 6.3 RESULTADOS

Em Análise microscópica, as lâminas foram analisadas quanto a presença ou não de imunomarcção e intensidade, sendo – ausência de imunomarcção, +- raros, + menos intenso, ++ intensidade moderada e +++ muito intenso (figura 5). Organizada em tabelas para comparação entre os grupos (tabela 3)

Figura 5 – Classificação quanto a coloração das lâminas sendo – ausência de imunomarcção, +- raros, + menos intenso, ++ intensidade moderada e +++ muito intenso



Fonte: Acervo pessoal

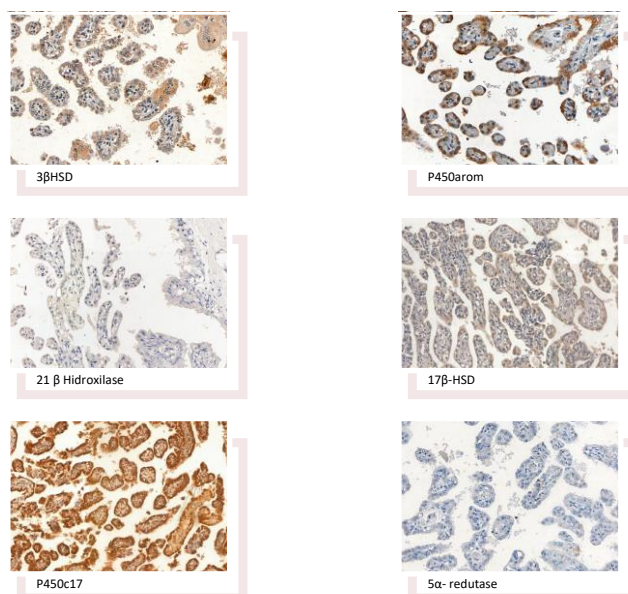
Tabela 3 – Classificação de presença ou ausência de imunomarcções das lâminas analisadas de tecidos corioalantóides de potros equinos e potros muares quanto aos anticorpos 3 $\beta$ HSD, 21  $\beta$  Hidroxilase, P450c17, P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -redutase

3 $\beta$ HSD				P450c17				5 $\alpha$ -redutase			
	CG	CNG	CP		CG	CNG	CP		CG	CNG	CP
Mariana	+++	++	++	Mariana	+-	++	+	Mariana	-	-	-
Fronteira	++	+++	+	Fronteira	+-	+	+	Fronteira	-	-	-
Madrid	+++	++	+++	Madrid	+	+	+	Madrid	-	-	+-
Isadora	+++	++	++	Isadora	+	+-	+	Isadora	-	-	-

Grécia	+	++	+	Grécia	++	++	+	Grécia	-	-	-
Floresta	++	++	+	Floresta	+++	++	++	Floresta	-	-	-
Esfinge	++	+	+	Esfinge	++	++	++	Esfinge	-	-	-
Mariana 2	++	+++	+++	Mariana 2	++	+	+	Mariana 2	-	-	-
<b>P450c21</b>				<b>P450arom</b>				<b>17 17βHSD</b>			
	CG	CNG	CP		CG	CNG	CP		CG	CNG	CP
Mariana	+	++	++	Mariana	+-	+-	-	Mariana	++	++	+-
Fronteira		++	++	Fronteira	+	+-	-	Fronteira			
Madrid	+	+++	+++	Madrid	+-	+-	+-	Madrid	+	+-	+-
Isadora	++	++	+	Isadora	-	+	-	Isadora	+	+-	+
Grécia	+++	+	+	Grécia	+-	+-	+-	Grécia	+	++	+-
Floresta	+	++	++	Floresta	+	++	+-	Floresta	+	+	+-
Esfinge	+	++	++	Esfinge	+-	+-	+-	Esfinge	+	+-	+
Mariana 2	+++	+	++	Mariana 2	+-	+-	+-	Mariana 2	-	-	-

As enzimas tem imunomarcações em locais específicos já relatados pela empresa comercializadora, sendo elas As proteínas se encontram em locais específicos em cada anticorpo, sendo: 3βHSD (figura 2A) foi localizada no reticulo endoplasmático, 21 β Hidroxilase (figura 2B) no retículo endoplasmático, P450c17(figura 2C) é encontrado na membrana celular, P450arom (figura 2D) membrana celular, 17β-HSD (figura 2E) membrana celular enquanto 5α- redutase (figura 2F) está presente no microsoma e reticulo endoplasmático celular, porém devido ao aumento usado na microscopia analisada, as proteínas aparecem coradas em região de citoplasma.

Figura 6 – Tecidos corioalantóides de mueres corados por técnica de imunohistoquímica representando reação e presença de imunomarcação, respectivamente 3βHSD, 21 β Hidroxilase, P450c17, P450arom, 17β-HSD, 5α- redutase. Microscopio Olympus BX61VS aumento 40x.



Fonte: Acervo Pessoal

## 6.4 DISCUSSÃO

Segundo levantamento bibliográfico, não existem análises prévias de esteroidogênese placentária em potros muares, nosso estudo apresentou muitas similaridades quanto a presença ou não de marcação das enzimas analisadas, tendo diferenças pontuais, porém esse estudo tem como limitação o baixo número de animal estudados o que pode ter influenciado os resultados observados. Já foi relatado em equinos a cascata esteroidogênica durante a gestação, sendo complexa e tendo a unidade feto-placentária como órgão endócrino e metabolizadora dos hormônios necessários durante a gestação (REGNAULT et al., 2002; STAMMERS et al., 1995).

A placenta de potros muares apresenta diferenças morfológicas já estudadas e relatadas (SABER *et al.*, 2008), o fator determinante para o crescimento fetal é a capacidade de troca fetomaternal, que também depende da morfologia, tamanho e fluxo sanguíneo da placenta (FOWDEN *et al.*, 2006) que está diretamente ligada a produção de hormônios estrógenos.

A supressão de estrógenos durante o fim da gestação pode influenciar na vascularização e oxigenação do feto (LOUX *et al.*, 2020; PASHEN; ALLEN, 1979) podendo influenciar no desenvolvimento intrauterino e tempo de adaptação extrauterina neonatal.

Potros muares atingem uma adaptação ao meio externo de forma mais rápida que potros equinos quanto a frequência cardíaca, frequência respiratória, tônus muscular e irritabilidade reflexa (RICCIO, 2017) podendo estar relacionada a um desenvolvimento mais completo intrauterino.

A presença de  $3\beta$ HSD ao final da gestação na placenta já foi descrita em equinos, humanos e ratos (CHAVATTE et al., 1997; YAMAMURA et al., 2014) importantes para a produção de progestágenos e manutenção da gestação. No presente estudo há presença intensa de marcação dessa enzima entre os grupos comparados, indicando provavelmente que apesar das diferenças genotípicas, ela segue funcional, tendo mais intensidade de marcação em corpo do útero no grupo de muares, indicando que o local com maior metabolização de precursores de hormônios estrógenos pode ocorrer nessa região

O grupo de muares também apresentou pequena diferença de intensidade quanto a enzima aromatase, que mesmo em pontos raros estando presentes, esteve mais intensa. Ligada a metabolização de DHEA em androstenediona e testosterona, posteriormente sendo transformado em estradiol e estrona, que podem estimular o desenvolvimento de vasos sanguíneos tanto no compartimento materno quanto fetal como observados em  $3\beta$ HSD que teve mais intensidade de imunomarcação em região de corpo de útero no grupo de neonatos muares, formação de receptores de ocitocina estimulando as concentrações miométrais (PASHEN; ALLEN, 1979; VAALA, 1994) levantando a possibilidade de estar mais presentes em muares devido ao tempo gestacional ser mais longo e tendo um acúmulo maior das enzimas.

Quanto as enzimas P450c17 encontrada em baixa concentração do terço final da gestação equina (LEGACKI et al., 2019a), P450c21 que apresenta atividade intensa próxima ao parto devido a metabolização de cortisol (BARNES; COMLINE; SILVER, 1978; CLYMAN et al., 1981; LIGGINS, 1976),  $17\beta$ HSD que está presente durante todo o período gestacional já que está ligada a primeiras metabolizações, produzindo assim alguns precursores para sintetizações posteriores (LOUX et al., 2020) e P450arom que está presente em todo o tempo gestacional, já que é uma das enzimas que produz precursores para as outras metabolizações (LOUX et al., 2020) que tem atividade reduzida próximo ao parto, com declínio após o 7/8 mês de gestação (COX, 1975; PASHEN, 1984; PASHEN; ALLEN, 1979) apresentam similaridades entre os grupos estudados quanto a presença ou ausência de reação,



tendo assim funções similares nas gestações independente de diferenças estereológicas já sugeridas (TINEL et al., 2023).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, A. P.; ANTCZAK, D. F. Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 753–763, 2001.

ALLEN, W. R. Factors influencing pregnant mare serum gonadotrophin production. **Nature**, v. 223, n. 5201, p. 64–66, 1969.

ALLEN, W. R.; SKIDMORE, J. A.; STEWART, F.; ANTCZAK, D. F. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. **Reproduction**, v. 98, n. 1, p. 55–60, 1993.

ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, n. 8, p. 623–634, 2001.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. A review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v. 30, n. 12, p. 1005–1015, 2009a.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. A review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v. 30, n. 12, p. 1005–15, 2009b.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 123, n. 3, p. 445–453, 2002.

ALONSO, M. A.; BOAKARI, Y. L.; RICCIO, A. V.; BELLI, C. B.; FERNANDES, C. B. Perinatal parameters of mule and equine foals: Similarities and differences. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 63, p. 31–35, 1 maio 2023.

BATISTA, C. S. Progesterona e Progestágenos: Síntese, Classificação e Uso. **Femina**, p. 639–644, 2004.

BHAVNANI, B. R.; SHORT, R. V; SOLOMON, S. Formation of estrogens by the pregnant mare: I. Metabolism of 7-3H-Dehydroisoandrosterone and 4-14C-Androstenedione injected into the umbilical vein. **Endocrinology**, v. 85, n. 6, p. 1172–1179, 1969.

BOETA, M.; ZARCO, L. Luteogenic and luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare. **Animal reproduction science**, v. 130, n. 1–2, p. 57–62, 2012.

CANISSO, I. F.; PANZANI, D.; MIRÓ, J.; ELLERBROCK, R. E. Key aspects of donkey and mule reproduction. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 35, n. 3, p. 607–642, 2019.

CHAVATTE, P.; HOLTAN, D.; OUSEY, J. C.; ROSSDALE, P. D. Biosynthesis and possible biological roles of progestagens during equine pregnancy and in the newborn foal. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. S24, p. 89–95, 1997.

CHAVATTE, P. M.; ROSSDALE, P. D.; TAIT, A. D. Modulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) activity in the equine placenta by pregnenolone and progesterone metabolites. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 342–347, 1995.

CHAVATTE-PALMER, P.; DUCHAMP, G.; PALMER, E.; OUSEY, J. C.; ROSSDALE, P. D.; LOMBÈS, M. Progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in the uterus and mammary glands of mares from mid- to late gestation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 56, p. 661—672, 2000.

CHOI, Y.-H.; VELEZ, I. C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; HINRICHS, K. Timing factors affecting blastocyst development in equine somatic cell nuclear transfer. **Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")**, v. 17, n. 2, p. 124–130, 2015.

COMLINE, R. S.; SILVER, M. PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> and pH levels in the umbilical and uterine blood of the mare and ewe. **The Journal of Physiology**, v. 209, n. 3, p. 587, 1970.

CONLEY, A. J. Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 355-365, 2016..

CONLEY, Alan J.; BALL, Barry A. Steroids in the establishment and maintenance of pregnancy and at parturition in the mare. **Reproduction**, v. 158, n. 6, p. R197-R208, 2019..

CONLEY, A. J.; SCHOLTZ, E. L.; LEGACKI, E. L.; CORBIN, C. J.; KNYCH, H. K.; DUJOVNE, G. D.; BALL, B. A.; MOELLER, B. C.; STANLEY, S. D. 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone concentrations and synthesis in non-pregnant mares. **Journal of Endocrinology**, v. 238, n. 1, p. 25–32, 1 jul. 2018.

DAVIES, I. John; RYAN, Kenneth J. Comparative endocrinology of gestation. **Vitamins & Hormones**, v. 30, p. 223-279, 1972.

ESTELLER-VICO, A.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H. T.; SQUIRES, E. L. Endocrine changes, fetal growth, and uterine artery hemodynamics after chronic estrogen suppression during the last trimester of equine pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 2, p. 414–423, 1 fev. 2017.

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 3, p. 676–682, 1995.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J.; OUSEY, J. C. The endocrinology of equine parturition. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, p. 393-403, 2008.

FOWDEN, A. L.; LI, J.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, n. 1, p. 113–122, 1998.

FOWDEN, A. L.; WARD, J. W.; WOODING, F. P. B.; FORHEAD, A. J.; CONSTANCIA, M. Programming placental nutrient transport capacity. *Em: Journal of Physiology*, 1., 2006, [...]. 2006. v. 572, p. 5–15.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. A cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v. 424, n. 6949, p. 635, 2003.

GLASSER, S. R. (1975). A molecular bioassay for progesterone and related compounds. In **Methods in Enzymology** (Vol. 36, pp. 456–465). Academic Press.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. P. Fetal nutrition and adult disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1344S-1352S, 2000.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology2. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 3, p. 953–972, 1 mar. 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1992.703953x>>.

HAGGARTY, P.; ALLSTAFF, S.; HOAD, G.; ASHTON, J.; ABRAMOVICH, D. R. Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. **Placenta**, v. 23, n. 1, p. 86–92, 2002.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1451–1465, 1999.

HOLTAN, D. W.; NETT, T. M.; ESTERGREEN, V. L. Plasma progestagens in pregnant mares. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 419–424, 1975.

LEGACKI, Erin L. et al. Equine fetal adrenal, gonadal and placental steroidogenesis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 157, n. 5, p. X1, 2019.

LEGACKI, E. L.; BALL, B. A.; CORBIN, C. J.; LOUX, S. C.; SCOGGIN, K. E.; STANLEY, S. D.; CONLEY, A. J. Equine fetal adrenal, gonadal and placental steroidogenesis. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p. 445–454, 2017a.

LEGACKI, E. L.; BALL, B. A.; CORBIN, C. J.; LOUX, S. C.; SCOGGIN, K. E.; STANLEY, S. D.; CONLEY, A. J. Equine fetal adrenal, gonadal and placental steroidogenesis. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p. 445–454, 2017b.

LEGACKI, E. L.; JO CORBIN, C.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; STANLEY, S. D.; CONLEY, A. J. Steroidogenic enzyme activities in the pre- and post-parturient equine placenta. **Reproduction**, v. 155, n. 1, p. 51–59, 2018.

LEGACKI, E. L.; SCHOLTZ, E. L.; BALL, B. A.; ESTELLER-VICO, A.; STANLEY, S. D.; CONLEY, A. J. Concentrations of sulphated estrone, estradiol and dehydroepiandrosterone measured by mass spectrometry in pregnant mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 802–808, 1 nov. 2019b.

LEGACKI, E. L.; SCHOLTZ, E. L.; BALL, B. A.; STANLEY, S. D.; BERGER, T.; CONLEY, A. J. The dynamic steroid landscape of equine pregnancy mapped by mass spectrometry. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 421–430, 1 abr. 2016.

LOUX, S. C.; CONLEY, A. J.; SCOGGIN, K. E.; ALI, H. E.-S.; DINI, P.; BALL, B. A. New insights in equine steroidogenesis: an in-depth look at steroid signaling in the placenta. **Reproduction**, v. 160, n. 1, p. 65–82, 2020.

MOOR, R. M.; ALLEN, W. R.; HAMILTON, D. W. Origin and histogenesis of equine endometrial cups. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 391–395, 1975.

MÖSTL, E. The horse feto-placental unit. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 102, n. 03, p. 166–168, 1994.

NETO, A. A.; BALL, B. A.; BROWNE, P.; CONLEY, A. J. NETO, AC Assis et al. Cellular localization of androgen synthesis in equine granulosa-theca cell tumors: Immunohistochemical expression of 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase cytochrome P450. **Theriogenology**, v. 74, p. 393–401, 2010.

NORONHA, L. E.; ANTCZAK, D. F. Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. **American journal of reproductive immunology**, v. 64, n. 4, p. 231–244, 2010.

OLIVERA, R.; MORO, L. N.; JORDAN, R.; LUZZANI, C.; MIRIUKA, S.; RADRIZZANI, M.; DONADEU, F. X.; VICHERA, G. In vitro and in vivo development of horse cloned embryos generated with iPSCs, mesenchymal stromal cells and fetal or adult fibroblasts as nuclear donors. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164049, 2016.

OUSEY, J. C.; FORHEAD, A. J.; ROSSDALE, P. D.; GRAINGER, L.; HOUGHTON, E.; FOWDEN, A. L. Ontogeny of uteroplacental progestagen production in pregnant mares during the second half of gestation. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 2, p. 540–548, 2003a.

OUSEY, J. C.; FORHEAD, A. J.; ROSSDALE, P. D.; GRAINGER, L.; HOUGHTON, E.; FOWDEN, A. L. Ontogeny of uteroplacental progestagen production in pregnant mares during the second half of gestation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 540–548, 1 ago. 2003b.

PASHEN, R. L.; ALLEN, W. R. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 27, p. 499–509, 1979.

POZOR, M. Equine placenta - A clinician's perspective. Part 1: Normal placenta - Physiology and evaluation. **Equine Veterinary Education**, v. 28, p. 327–334, 2015.

POZOR, M. A.; SHEPPARD, B.; HINRICHS, K.; KELLEMAN, A. A.; MACPHERSON, M. L.; RUNCAN, E.; CHOI, Y. H.; DIAW, M.; MATHEWS, P. M. Placental abnormalities in equine pregnancies generated by SCNT from one donor horse. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1573–1582, 27 fev. 2016.

REGNAULT, T. R. H.; GALAN, H. L.; PARKER, T. A.; ANTHONY, R. V. Placental development in normal and compromised pregnancies - A review. **Placenta**, v. 23, n. SUPPL. 1, 2002.

RICCIO, A. V. Avaliação dos parâmetros etológicos, laboratoriais e do perfil oxidativo de neonatos muares no primeiro mês de vida: um comparativo com equinos. **Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)**, 2017.

ROSER, J. F.; MEYERS-BROWN, G. Enhancing fertility in mares: recombinant equine gonadotropins. **Journal of equine veterinary science**, v. 76, p. 6–13, 2019.

ROSSO, P. Nutrition and maternal-fetal exchange. **American journal of clinical nutrition**, v. 34, n. 4, 1981.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, D. H. **Studies on the equine placenta III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast**. [s.l: s.n.].

SABER, A.; ABD-ELNAEIM, M.; HEMBES, T.; PFARRER, C.; SALIM, A.; LEISER, R. Light and scanning electron microscopic study on the blood vascular system of the Donkey placenta. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 37, n. 2, p. 86–94, abr. 2008.

SHORT RV. Progesterone in blood. IV. Progesterone in the blood of mares. **The Journal of Endocrinology**, v. 19, p. 207–210, 1959.

SILVER, M.; COMLINE, R. S. Transfer of gases and metabolites in the equine placenta: a comparison with other species. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 589–594, 1975.

SILVER, M.; FOWDEN, A. L. Prepartum adrenocortical maturation in the fetal foal: responses to ACTH1–24. **Journal of Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 417–425, 1994.

SOUZA, A. M. de. Arquitetura e estrutura da placenta equina durante a gestação. 2014.



STAMMERS, J. P.; HULL, D.; SILVER, M.; FOWDEN, A. L. Fetal and maternal plasma lipids in chronically catheterized mares in late gestation: effects of different nutritional states. **Reproduction, fertility and development**, v. 7, n. 5, p. 1275–1284, 1995.

TOLOSA, E. M.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Em: 2003, 1. Ed. São Paulo. [...]. 1. Ed. São Paulo: 2003.

VERONESI, M. C.; VILLANI, M.; WILSHER, S.; CONTRI, A.; CARLUCCIO, A. A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, 2010.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Factors influencing placental development and function in the mare **Equine Veterinary Journal** Ltd, 2012.

WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K.; LI, G.-P.; ASTON, K. I.; BUNCH, T. D.; MEERDO, L. N.; PATE, B. J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science**, v. 301, n. 5636, p. 1063, 2003.

WYNN, M. A. A.; BALL, B. A.; LEGACKI, E.; CONLEY, A.; LOUX, S.; MAY, J.; ESTELLER-VICO, A.; STANLEY, S.; SCOGGIN, K.; SQUIRES, E.; TROEDSSON, M. Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase alters pregnane metabolism in the late pregnant mare. **Reproduction**, v. 155, n. 3, p. 251–258, 2018.