

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

TESE

**Concentração de Progesterona, Metabólito de PGF 2α e Mudanças na
Expressão Gênica do Endométrio Causado pela Presença do Embrião em
Éguas**

Thadeu de Castro

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA, METABÓLITO DE PGF₂ α E
MUDANÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO ENDOMÉTRIO CAUSADO
PELA PRESENÇA DO EMBRIÃO EM ÉGUAS**

THADEU DE CASTRO

Sob a Orientação do Professor

Dr. Júlio Cezar Ferraz Jacob

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C355c Castro, Thadeu, 1985-
Concentração de Progesterona, Metabólito de PGF2 α e
Mudanças na Expressão Gênica do Endométrio Causado
pela Presença do Embrião em Éguas. / Thadeu Castro. -
Muqui, 2022.
105 f.: il.

Orientador: Júlio Cezar Ferraz
Jacob. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Medicina
Veterinária , 2022.

1. Reprodução equina . 2. Expressão gênica . 3.
Gestação . 4. PGFM. 5. PGE2. I. Jacob, Júlio Cezar
Ferraz, 1961-, orient. II Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Pósgraduação em Medicina
Veterinária III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

THADEU DE CASTRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 23/02/2022.

Prof. Dr. Júlio Cezar Ferraz Jacob - UFRRJ
(Orientador)

Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello - UFRRJ

Profa. Dra. Vera Lucia Teixeira de Jesus - UFRRJ

Profa. Dra. Aline Emerim Pinna - UFF

Prof. Dr. Gustavo Mendes Gomes - USS

“À minha família”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar sempre comigo, me guiando pelo melhor caminho.

À minha família por sempre me ajudar a tomar as decisões e me estimular ao estudo científico. Minha esposa Andrea, meu pai Jarbas, minha mãe Maria de Lourdes, meus irmãos Chirlei e Tiago.

À minha filha Sophia por me proporcionar momentos de afeto, felicidade e me motivar cada dia a estar sempre procurando melhoras na minha vida.

À Eutheria Foundation e à University of Wisconsin Madison por disponibilizar o espaço físico, equipamentos e materiais para análises das amostras.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – PPGMV pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DRAA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela disponibilização dos animais.

Ao Professor Dr. Oliver Joseph Ginther pelo delineamento do projeto e aos ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. Júlio Cezar Ferraz Jacob pelos ensinamentos, confiança, orientação e estar sempre disponível.

Ao Dr. William Thatcher da Universidade da Florida por doar os anticorpos de PGFM.

À August Hoppmann pela ajuda com análises no laboratório.

A todos do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial aos professores Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus e Marco Roberto Bourg de Mello, pelo apoio e incentivo, aos funcionários, Luis, Nem, Nézio, Zico e Zezinho pela ajuda com os animais.

Aos funcionários do Setor das Matrizes do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Camila, Beto, Mineiro, Nori e Renato por compartilhar os dias de trabalho e ajuda com manejo dos animais.

Aos amigos Rafael Reis Domingues, Thiago Virira, Giselle Stefani, Flávia Lima, Flávia Vieira por possibilitar que este projeto fosse conduzido da melhor forma.

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

Enfim, o meu sincero agradecimento a todos que, de alguma forma, compartilharam desta caminhada.

RESUMO GERAL

CASTRO, Thadeu. **Concentração de progesterona, metabólito de PGF2 α e mudanças na expressão gênica do endométrio causado pela presença do embrião em éguas.** 2022. 76p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2022.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a relação entre as concentrações de progesterona (P4) e metabólito de PGF2 α (PGFM) durante o período interovulatório em éguas não gestantes e comparar com o mesmo período em éguas gestantes, e avaliar efeitos local do embrião na expressão gênica endometrial durante o dia (dia 12, dia 0 = ovulação) de máxima mobilidade embrionária. Este estudo foi realizado em dois experimentos e é apresentado em dois capítulos respectivamente. No primeiro experimento, foram utilizadas égua não gestantes (n = 8) e éguas gestantes (n = 9) para avaliar as concentrações de P4 e PGFM. A hipótese 1 foi que as concentrações diárias de PGFM aumentam na interseção entre o final do aumento de P4 e a diminuição gradual de P4 (~ dia 6) em éguas não gestantes. A hipótese 2 foi que éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias correspondentes aos pulsos de alta amplitude na luteólise em éguas não gestantes. A concentração de P4 aumentou entre o dia da ovulação e ~ dia 6, e em seguida, diminuiu gradualmente até o início da luteólise em éguas não gestantes. Antes do início da luteólise, não houve diferença significativa na concentração de P4 entre as éguas não gestantes e gestantes. Nas éguas não gestantes, a concentração de PGFM aumentou no dia anterior ao início da luteólise ($P < 0,04$) e atingiu média máxima ($42,9 \pm 11,6$ pg/mL) no dia 14. Nas éguas gestantes, um aumento inédito de PGFM ocorreu a partir do dia 12 até uma média máxima no dia 15 ($16,7 \pm 3,1$ pg/mL). As concentrações diárias de PGFM não foram diferentes entre as éguas não gestantes e gestantes até antes da luteólise nas éguas não gestantes. Durante as sessões de 8 horas de coleta das amostras, as concentrações média e máxima de PGFM foram significativamente maiores nas éguas não gestantes do que nas éguas gestantes para cada sessão de 8 horas nos dias 13, 14 e 15. Os pulsos foram igualmente pequenos para os conjuntos de dias 4–7 e 9–11 nas éguas não gestantes e para todos os conjuntos de dias nas éguas gestantes. No segundo experimento, a expressão gênica do endométrio foi comparada entre o corno uterino com e sem o embrião de éguas gestantes (n = 13) e nos cornos uterinos de éguas não gestantes (n = 10). A hipótese 3 foi que há um aumento na produção de PGE2 e PGF2 α no corno uterino adjacente ao embrião. Escova de citologia uterina foi utilizada para coletar amostras no seguimento médio de cada corno uterino no dia 12. Nas éguas não gestantes, não houve diferença na expressão gênica de qualquer gene avaliado entre os cornos uterinos ipsilateral e contralateral ao CL. Para a expressão gênica dos receptores de estrógeno, ESR1 foi menos ($P < 0.03$) e ESR2 foi mais ($P < 0.04$) expressado em éguas gestantes do que em éguas não gestantes. A expressão gênica do gene relacionado a síntese de PGE2 (PTGES) foi maior ($P < 0.05$) no corno uterino com (1.40 ± 0.10) do que sem (0.89 ± 0.10) o embrião e foi mais expressado ($P < 0.05$) no corno uterino com o embrião do que nos cornos uterinos das éguas não gestantes (1.06 ± 0.10). Conclui-se que (1) não há um aumento de PGFM na interseção entre o final do aumento de P4 e a diminuição gradual de P4 (~ dia 6); (2) éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias correspondentes aos pulsos de alta amplitude na luteólise em éguas não gestantes; (3) o embrião regula localmente a síntese de PGE2 no endométrio adjacente ao embrião.

Palavras-chave: escova citológica, endométrio, gestação, PGFM, PTGES.

GENERAL ABSTRACT

CASTRO, Thadeu. **Concentration of progesterone, metabolite of PGF2 α , and embryo-mediate changes in endometrial gene expression in mares.** 2022. 76p. Thesis (Doctor of Science in Veterinary Medicina). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2022.

The aim of the present study was to characterize the relationship between progesterone (P4) and the metabolite of PGF2 (PGFM) during the interovulatory interval in nonbred mares, and to evaluate the gene expression in the endometrium on a day (Day 12, Day 0 = ovulation) of maximal embryo mobility. This study was carried out in two experiments and showed in two chapters consecutively. In the first experiment, were used nonbred mares (n = 8) and pregnant mares (n = 9) to evaluate the P4 and PGFM concentrations. Hypothesis 1 was that daily PGFM concentrations in nonbred mares increase at the intersection between the end of the rapid P4 increase and the gradual P4 decrease. Hypothesis 2 was that pregnant mares have low amplitude PGFM pulses during the days of the high amplitude pulses at luteolysis in nonbred mares. The first one daily blood samples, P4 increased between the day of ovulation (Day 0) and ~Day 6 and then gradually decreased until the beginning of luteolysis in the nonbred group. Before the beginning of luteolysis, there were no significant differences in P4 concentrations between the nonbred and early pregnancy. In the nonbred, PGFM concentration on the day before the beginning of luteolysis began to increase ($P < 0.04$) and reached a maximum mean (42.9 ± 11.6 pg/mL) on Day 14. In pregnancy, a novel increase in PGFM occurred from Day 12 to a maximum mean on Day 15 (16.7 ± 3.1 pg/mL). Daily PGFM concentrations were not different between the two groups until the increase just before luteolysis in the nonbred mares. During 8-h sessions of hourly blood sampling, the mean and maximum PGFM concentrations were significantly greater in nonbred than in pregnancy for each 8-h session on Days 13, 14, and 15. The pulses were similarly small for day-sets 4–7 and 9–11 in the nonbred and for all day-sets in pregnancy. In the second experiment, gene expression in the endometrium was compared among uterine horn with and without the embryo in pregnant mares (n = 13) and in the uterine horns of nonbred mares (n = 10). The hypothesis 3 was that the embryo locally upregulates PGE2 and PGF2 α synthesis in the endometrium adjacent to the embryo. A cytobrush was used to collect an endometrial sample from the middle of each uterine horn. In nonbred mares, there was no difference for any of the considered gene expressions between the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL or for side (left vs right). For endometrial estrogen receptors, ESR1 was lower ($P < 0.03$) and ESR2 was greater ($P < 0.04$) for pregnant than nonbred mares. The mRNA abundance for PGE2 synthase (PGES) was greater ($P < 0.05$) in the horn with (1.40 ± 0.10) than without (0.89 ± 0.10) the embryo and was greater ($P < 0.05$) in the horn with the embryo than in the combined horns of nonbred mares (1.06 ± 0.10). It was concluded that (1) daily PGFM concentrations do not increase at the intersection between the end of the rapid P4 increase and the gradual P4 decrease; (2) pregnant mares have low amplitude PGFM pulses during the days of the high amplitude pulses at luteolysis in the nonbred mares; (3) the embryo locally upregulates PGE2 synthesis in the endometrium adjacent to the embryo.

Keywords: cytobrush, edometrium, pregnancy, PGFM, PTGES.

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Concentração de P4, fluxo sanguíneo e área do CL durante ciclo estral. Fonte: adaptado de Ginther et al. (2007a)03
- Figura 2.** Esquema de coleta de amostras de sangue. 8 h, coleta de hora em hora durante 8 horas; OV, dia da ovulação.....18
- Figura 3.** Média \pm SEM para concentrações de P4 (painel superior) e PGFM (painel inferior) nos dias 0 a 18 após a ovulação no grupo éguas não gestantes e no grupo éguas gestantes com continuação até o dia 24 no grupo éguas gestantes. As probabilidades que foram significativas para o efeito principal do grupo (G) e hora (H) e a interação do grupo por hora (GH) são apresentadas para cada painel. Um círculo acima do eixo do dia do painel superior indica o dia de início da luteólise para cada égua individual no grupo éguas não gestante. Um asterisco (*) acima do eixo do dia indica uma diferença ($P < 0,05$) entre os dois grupos. Um asterisco (*) em um arco entre duas médias indica uma diferença ($P < 0,05$) entre as duas médias. P4, progesterona; PGFM, metabólito de PGF2 α21
- Figura 4.** Média \pm SEM para as concentrações máximas de P4 e PGFM nos dias -2 a 5 desde o início da luteólise (painel esquerdo) e nos dias -5 a 2 a partir do final da luteólise (painel direito) no grupo éguas não gestantes. Um asterisco (*) em um arco entre duas médias indica uma diferença ($P < 0,05$) entre as duas médias. P4, progesterona; PGFM, metabólito PGF2 α22
- Figura 5.** Média \pm SEM para valores médio, máximo e mínimo das concentrações de PGFM e número de pulsos identificados por CV em sessões de 8 h de amostragem por hora para cada dia em éguas não gestantes e éguas gestantes. As probabilidades que foram significativas para o efeito principal do grupo (G) e hora (H) e a interação do grupo por hora (GH) são apresentadas para cada painel. Um asterisco (*) acima do eixo do dia indica uma diferença ($P < 0,05$) entre os dois grupos. CV, coeficiente de variação; PGFM, metabólito PGF2 α23
- Figura 6.** Média \pm SEM para as concentrações de PGFM para todos os pulsos identificados por CV e para o pulso mais pronunciado identificado por CV em sessões de 8 horas em cada um dos conjuntos de dias 4-7, 9-11 e 13-16 nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes. As probabilidades que foram significativas para o efeito principal do grupo (G) e hora (H) e a interação do grupo por hora (GH) são apresentadas para cada painel. Um asterisco (*) acima do eixo do dia indica uma diferença ($P < 0,05$) entre os dois grupos. CV, coeficiente de variação; PGFM, metabólito PGF2 α25
- Figura 7.** Modelo para avaliação da mobilidade embrionária no útero. (1) segmento caudal do corpo do útero, (2) seguimento médio do corpo do útero, (3) seguimento cranial do corpo do útero, (4) seguimento caudal do corno uterino esquerdo, (5) seguimento médio do corno uterino esquerdo, (6) seguimento cranial do corno uterino esquerdo, (7) seguimento caudal do corno uterino direito, (8) seguimento médio do corno uterino direito, (9) seguimento cranial do corno uterino direito.....35
- Figura 8.** Desenho experimental para coleta de amostra endometrial com escova citológica no grupo éguas gestantes no dia 12. Imagem ultrassonográfica por via transretal foi realizada a cada 10 minutos até que a vesícula embrionária (círculo amarelo) se movesse do seguimento

cranial do corpo do útero para o segmento médio de um dos cornos uterinos. Quando o embrião foi localizado no segmento médio de um dos cornos uterinos, uma escova citológica foi inserida por via intravaginal e suavemente introduzida no corno uterino com o embrião. Amostras endometriais foram coletadas no corno aproximadamente 5 mm caudal ao embrião no primeiro exame. Imediatamente depois disso, uma segunda amostra foi coletada no segmento médio do corno uterino oposto que não continha o embrião. A coleta das amostras endometriais foi guiada por imagens ultrassonográfica.....37

Figura 9. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL no grupo éguas não gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene (sem diferenças significativas). PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase.....39

Figure 10. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL no grupo éguas gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene. PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase. Um asterisco (*) indica uma diferença significativa entre os dois cornos uterinos.....40

Figura 11. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino com e sem o embrião no grupo éguas gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene. PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase. Um asterisco (*) indica uma diferença significativa entre os dois cornos uterinos.....41

Figura 12. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino com o embrião, corno uterino sem o embrião e nos cornos uterinos de éguas não gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene. PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase. Um asterisco (*) indica

uma diferença significativa entre os dois cornos uterino. (a,b) Letras diferentes são diferentes entre si ($P < 0.05$).....42

Tabela 1. Média \pm SEM para os pontos principais de todos os pulsos de PGFM nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes.....24

Tabela 2. Sequências dos primers para os genes que foram analisados.....38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Ciclo estral em éguas.....	02
2.2 Luteólise.....	03
2.3 Reconhecimento materno da gestação.....	04
2.4 Reconhecimento da gestação em outras espécies.....	05
2.5 Reconhecimento materno da gestação em equinos.....	05
2.6 Gestação inicial e mobilidade embrionária.....	07
2.7 Síntese de prostaglandina no endométrio.....	09
2.8 Ultrassonografia.....	10
2.8.1 Ultrassonografia Doppler colorido.....	10
2.8.2 Modo espectral.....	11
2.8.3 Modo Doppler colorido.....	11
3 CAPÍTULO I: CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA E METABÓLITO DE PGF₂α DURANTE O PERÍODO INTEROVULATÓRIO EM ÉGUAS NÃO GESTANTES COMPARADO COM OS MESMOS DIAS CORRESPONDENTES EM ÉGUAS GESTANTES	13
3.1 Resumo.....	14
3.2 Abstract	15
3.3 Introdução	16
3.4 Material e Métodos	17
3.4.1 Local.....	17
3.4.2 Animais e inseminação.....	17
3.4.3 Delineamento experimental e coleta das amostras.....	18
3.4.4 PGFM.....	19
3.4.5 Análises hormonais	19
3.4.6 Análise estatística.....	20
3.5 Resultados	20
3.6 Discussão	25
3.7 Conclusões	29

4 CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES LOCAIS NA EXPRESSÃO GÊNICA ENDOMETRIAL MEDIADAS PELO EMBRIÃO DURANTE O PERÍODO DE MOBILIDADE EMBRIONARIA EM ÉGUAS	30
4.1 Resumo.....	31
4.2 Abstract	32
4.3 Introdução	33
4.4 Material e Métodos	34
4.4.1 Local.....	34
4.4.2 Animais e inseminação.....	34
4.4.3 Delineamento experimental.....	35
4.4.4 Área do CL.....	36
4.4.5 Fluxo sanguíneo do CL.....	36
4.4.6 Coleta de amostras endometriais.....	36
4.4.7 Extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação pelo qRT-PCR.....	37
4.4.8 Análise estatística.....	38
4.5 Resultados	39
4.6 Discussão	42
4.7 Conclusões	45
5 CONCLUSÕES GERAIS	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	62
A – Artigo publicado na revista Theriogenology. Capítulo I.....	62
B – Artigo publicado na revista Theriogenology. Capítulo II.....	70

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AINES: Anti-inflamatório não esteroides
cDNA: DNA complementar
CL: Corpo lúteo
Ct: Limiar de ciclo
CV: Coeficiente de variação
D: Dia
Dia 0: Dia da ovulação
Dia 0B: Dia do início da luteólise
Dia 0E: Dia do final da luteólise
Dia 0M: Dia de máxima concentração de PGFM
ER: Receptor de estrógeno
ESR1: Receptor de estrógeno alfa
ESR2: Receptor de estrógeno beta
G: Grupo
GAPDH: Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
h: Hora
hCG: Gonadotrofina coriônica humana
HPGD: Hidroxiprostaglandina desidrogenase
im: Intramuscular
IOI: Período interovulatório
iu: Intrauterino
iv: Intravenoso
Kg: Quilograma
LH: Hormônio luteinizante
mg: Miligrama
MHz: Megahertz
min: Minuto
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mRNA: RNA mensageiro
ng: Nanograma

OTNP1: Ocitocina-neurofisina I
OXTR: Receptor de Ocitocina
P4: Progesterona
pg: Picograma
PGE2: Prostaglandina E2
PGF2 α : Prostaglandina F2 Alfa
PGFM: Metabolito de prostaglandina F2 Alfa
PGFR: Receptor de prostaglandina F2 Alfa
PGH2: Prostaglandina H2
PGR: Receptor de progesterona
PLA2: Fosfolipase A2
PTGER2: Receptor de prostaglandina E2
PTGES: Prostaglandina E2 sintase
PTGFS: Prostaglandina F2 α sintase
PTGS1: Prostaglandina-endoperoxide sintase 1 - COX1
PTGS2: Prostaglandina-endoperoxide sintase 2 - COX2
RNA: Ácido Ribonucleico
qRT-PCR: Reação em cadeia pela transcriptase reversa quantitativa em tempo real
SAS: Sistema de Análise Estatística
sec: Segundos
SLCO2A1: Membro da família do transportador de ânion orgânico portador de soluto 2A1
 α : Alfa
 μ L: Microlitro

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atividades relacionadas com a indústria equestre no Brasil são responsáveis por gerar em torno de 3 bilhões de dólares anualmente para a economia do país e gerar mais de 3,6 milhões de empregos. O Brasil possui o terceiro maior rebanho de cavalos do mundo, ficando atrás apenas da China e México, com um total de 5,9 milhões de animais (IBGE, 2017). O estado de Minas Gerais possui o maior rebanho do país com 828.206 de animais (IBGE, 2021). Além disso, o cavalo é utilizado em esportes, trabalho, lazer, alimentação (carne equina) e medicina. No Brasil há registrado 26 raças de cavalos e seis outras de cavalos pônei. A raça líder em números de animais é a raça Mangalarga Marchador (644.000), seguido pelas raças Nordesteño (500.000), Quarto de Milha (346.936), Crioulo (322.000) e Mangalarga (10.000) (MAPA, 2016).

A profissionalização e o crescimento da equideocultura criam a necessidade de cada vez mais utilizar as biotecnologias da reprodução com o objetivo de aumentar a produção e facilitar o manejo equino (OLIVEIRA et al., 2014). Assim, o conhecimento e manipulação dos eventos reprodutivos tem-se tornado importantes para aplicação, aprimoramento e desenvolvimento de biotecnologias da reprodução.

A perda embrionária precoce em equinos é considerada uns dos maiores problemas da reprodução e foi reportado por ocorrer em 17,3% das gestações detectadas no dia 15, sendo que, a maioria das perdas (59,7%) ocorre entre os dias 15 e 35 dias de gestação (MORRIS & ALLEN, 2002). Portanto, conhecimento de fatores que interferem na reprodução, assim como, dos mecanismos fisiológicos da reprodução é crucial para sucesso na reprodução assistida em equinos.

A prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) é um dos principais hormônios envolvido na regulação do ciclo estral e da gestação. Os mecanismos fisiológicos de liberação e ação da PGF2 α são bem elucidados em éguas não gestantes durante o período de luteólise. No entanto, para nosso conhecimento, há poucas informações na literatura sobre a liberação de PGF2 α durante o início do ciclo estral e durante a gestação inicial em éguas.

O embrião equino se encontra móvel por todo lúmen uterino durante os dias 9–15 de gestação (GINTHER, 1992). A mobilidade embrionária é indispensável para interação entre o embrião e o ambiente materno (STOUT & ALLEN, 2001). A mobilidade embrionária parece ser conduzida por fatores provenientes do próprio embrião (BUDIK et al., 2021) e do tecido uterino (GINTHER et al., 1985). O embrião equino produz efeitos intrauterinos que causam a prevenção da luteólise (GINTHER, 1992) e efeitos locais na alteração das características morfofuncionais do útero (GRIFFIN et al., 1993). No entanto, um efeito local do embrião equino na expressão gênica endometrial *in vivo* aparentemente não foi relatado.

Diante disso, a presente tese foi conduzida com o objetivo de caracterizar a relação entre as concentrações de progesterona (P4) e metabólito de PGF2 α (PGFM) durante o período interovulatório em éguas não gestantes e comparar com o mesmo período em éguas gestantes e, avaliar efeitos local do embrião na expressão gênica endometrial durante o dia (dia 12, dia 0 = ovulação) de máxima mobilidade embrionária. Este estudo foi realizado em dois experimentos e é apresentado em dois capítulos (Capítulo I e Capítulo II, respectivamente).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral em éguas

O ciclo estral em égua é definido como uma sequência de eventos que preparam a égua para concepção ou como período entre duas ovulações subsequentes. O ciclo estral em éguas é composto de uma fase folicular e uma fase lútea. A fase folicular geralmente possui duração média de 6 dias, podendo variar de 4 a 10 dias, dependendo da égua e da raça. O intervalo médio entre duas ovulações consecutivas é de 21 dias. A fase lútea, é a fase que compreende o tempo entre a ovulação e a regressão corpo lúteo (CL), que normalmente dura 15 dias (SATUÉ & GARDÓN, 2013). Essas fases são caracterizadas por modificações internas dos órgãos sexuais e do sistema glandular, assim como alterações comportamentais baseadas nos níveis de estrógeno (E2) (fase folicular) e progesterona (P4) (fase lútea) (AURICH, 2011).

As éguas são animais considerados poliétricos sazonais, ou seja, possuem atividade reprodutiva numa determinada época do ano. A estação reprodutiva das éguas ocorre do início da primavera até o final do verão. Os equinos são considerados reprodutores fotoperíodo crescente, pois a atividade reprodutiva é estimulada principalmente pelo aumento do comprimento do dia (SILVA et al., 2015). Além do fotoperíodo, fatores como nutrição, idade, status reprodutivo, condição corporal e temperatura ambiental têm efeito sobre a atividade reprodutiva sazonal (NAGY et al., 2000). Portanto, algumas éguas podem apresentar ciclo fértil durante todo o ano (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As éguas são animais considerados monovulatórios, no entanto, podem apresentar duplas ovulações que variam de 7 a 25%. Dupla ovulação pode estar relacionada a fatores como raça, idade, status reprodutivo, manipulação farmacológica do ciclo estral e indivíduo (GINTHER, 1992). As ovulações duplas podem ocorrer de forma sincrônica ou com intervalos de dois dias ou mais. Os animais com duplas ovulações geralmente apresentam folículos menores durante o período de crescimento folicular e dominância (GINTHER et al., 2008a). Éguas com duplas ovulações apresentam concentração plasmática de P4 maior do que éguas com ovulação única (GINTHER, 1992).

Quando ocorre ruptura do folículo levando à ovulação, o espaço ocupado previamente pelo folículo é invadido por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune (SANCHA et al., 2002), células endoteliais, células da teca interna e células da granulosa, que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia dando origem ao CL (BERTAN, 2006).

Na égua as células da teca interna não contribuem para formação do tecido lúteo (VAN NIEKERK et al., 1975). As células da teca interna se degeneram e são substituídas por fibroblastos hipertrofiados, tornando as células da granulosa a única responsável pela formação do CL. A luteogênese tem início durante o processo de maturação folicular, quando o aumento pré-ovulatório de LH resulta na luteinização das células da granulosa (WUTTKE et al., 1998). A luteinização das células da granulosa se conclui três dias após a ovulação e a hipertrofia das células luteais é observado até o nono dia após a ovulação (MCKINNON et al., 2011).

Nas éguas, o CL é composto por três tipos celulares: células lúteas pequenas, células lúteas grandes e células lúteas endoteliais. Foi demonstrado que as células lúteas grandes sofrem uma diminuição de tamanho entre a metade e o final do diestro e que a proporção de células lúteas pequenas aumenta diretamente com o decorrer dos dias do diestro (WATSON & SERTICH, 1990). Contudo, ambas as células lúteas grandes e pequenas possuem capacidade de realizar esteroidogênese (ALBRECHT & DAELS, 1997).

O LH é considerado um dos principais hormônios para o crescimento e função do CL (BAIRD, 1992). A liberação de LH a partir da hipófise promove a síntese e secreção de P4 pelo CL em animais domésticos (NISWENDER, 2002). Alguns estudos sugerem uma forte

evidência de que em éguas o LH é essencial para a secreção de P4 (CASTRO et al., 2016), e que a administração exógena de LH pode ter ação luteotrófica (WATSON, 1995).

A vascularização do CL possui correlação positiva com a produção de P4, com aumento a partir do dia da ovulação, atingido o pico em média no dia 8, diminuindo até o dia 14 onde se dá início a luteólise nas éguas não gestantes, com perda da funcionalidade do CL e queda brusca nas concentrações de P4 (Figura 1) (GINTHER et al., 2007a).

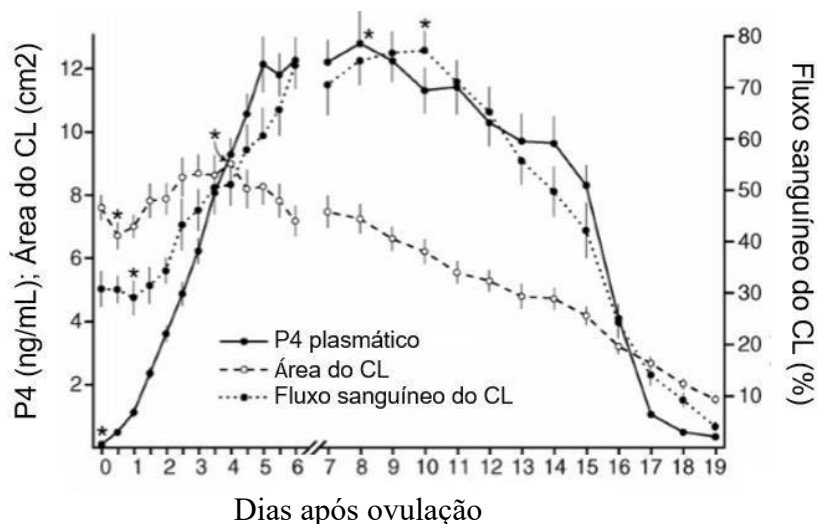


Figura 1. Concentração de P4, fluxo sanguíneo e área do CL durante o período interovulatório (entre duas ovulações). Fonte: Adaptado de Ginther et al. (2007a).

2.2 Luteólise

Na ausência de um embrião viável, ocorre a regressão funcional e estrutural do CL, evento denominado luteólise. A luteólise é dividida em três fases: pré-luteólise, luteólise e pós-luteólise. A fase de pré-luteólise ocorre antes do início da regressão do CL (~ dias 8–14). O início da luteólise pode ser definido quando ocorre uma diminuição diária ininterrupta $\geq 20\%$ da concentração de P4 comparado com o dia anterior (GINTHER et al., 2011a). A luteólise é o período durante a regressão do CL até que as concentrações de P4 tenha diminuído para < 1 ng/mL. O período após luteólise ocorre quando as concentrações de P4 são < 0.9 ng/mL e é denominado pós-luteólise (GINTHER & BEG, 2012a).

Na égua, a luteólise começa em média 14 dias após a ovulação ou 9 dias antes da próxima ovulação e dura aproximadamente 23 horas, com base na amostragem de sangue de hora em hora (GINTHER et al., 2011a). A regressão luteal envolve a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em vários pulsos sequenciais durante a duração do período luteolítico (dois a quatro pulsos) (GINTHER et al., 2009). A $\text{PGF2}\alpha$ possui meia vida curta (94 segundos) e a concentração plasmática de seu principal metabólito, 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF2}\alpha$ (PGFM), é comumente usada para representar mudanças na síntese de PGF (SHRESTHA et al., 2012). A concentração de pico de PGFM não difere entre um pulso pré-luteolítico e de transição, mas as concentrações de pico aumentam progressivamente entre o primeiro pulso luteolítico e o segundo pulso luteolítico (GINTHER et al., 2012).

Em éguas o pulso de $\text{PGF2}\alpha$ que inicia a luteólise (pulso de transição) é relativamente pequeno. Aproximadamente oito horas antes do pulso de transição, o CL é exposto na maioria das éguas (67%) a dois ou três pulsos de PGFM pré-luteolíticos de magnitude semelhante ao pulso de transição em um intervalo médio de pico a pico de 8 horas (GINTHER et al., 2012).

A ausência de pulsos de PGFM durante a pré-luteólise em 33% das éguas e os pulsos pequenos nos outros 67% indicam que os pulsos de PGFM durante a pré-luteólise não são fisiologicamente essenciais para a luteólise em éguas (GINTHER et al., 2012). Outros hormônios ou fatores relacionados parecem estar envolvidos no início da luteólise em éguas, aumentando a resposta do CL ao pequeno pulso de PGFM na hora da transição da pré-luteólise a luteólise (GINTHER & BEG, 2012a). O cortisol e estradiol foram associados temporalmente com um pulso de PGFM durante a luteólise, mas não com um pulso durante a pré-luteólise ou com o pulso de transição (GINTHER & BEG, 2011). O estradiol não começa a aumentar até 5 horas após o pulso de transição (GINTHER et al., 2012).

As concentrações de ocitocina não aumentam durante o último pulso pré-luteolítico de PGFM, mas aumentam e diminuem simultaneamente com a porção ascendente e descendente do pulso de transição e com o primeiro pulso luteolítico de PGFM. O aumento da ocitocina parece ser responsável por pelo menos em parte pela diminuição das concentrações de P4 no momento da transição da pré-luteólise para a luteólise (GINTHER & BEG, 2012a). Em éguas, o ovário não é fonte de ocitocina ao contrário do que se observa em ruminantes domésticos, onde o CL sintetiza e secreta ocitocina durante o ciclo estral (STOUT & ALLEN, 1999). A ocitocina em éguas é produzida pelo hipotálamo e liberada pela hipófise. Os estudos feitos para esclarecer o papel da ocitocina durante o ciclo estral mostraram que ela parece ter um papel na luteólise das éguas como intermediário que estimula a secreção de PGF do útero (VANDERWALL et al., 1998).

Em éguas, as concentrações de P4 durante a luteólise diminuem linearmente durante as horas de um pulso de PGFM e entre o nadir final de um pulso e o nadir inicial do próximo pulso (GINTHER et al., 2008b; GINTHER et al., 2011b). Pulsos substanciais de LH são detectados durante a pré-luteólise e a luteólise. Durante a luteólise, a concentração de LH aproximadamente dobra em relação à pré-luteólise. No entanto, as concentrações de P4 não aumentam dentro de um pulso de LH (GINTHER et al., 2011a).

Concentrações de P4 $\leq 0,9$ ng/mL são usadas para representar pós-luteólise. A progesterona continua a diminuir lentamente após o fim da luteólise. O declínio nas concentrações de P4 de 0,9 para 0,1 ng/mL requer 22 a 32 horas. Não se sabe se os pulsos de PGFM proeminentes após o final da luteólise são necessários para a continuação lenta da diminuição de P4 ou se possuem outro propósito (GINTHER et al., 2011a).

Nas éguas gestantes, não ocorre a luteólise e o CL é o responsável pela produção de P4 e manutenção da gestação até 35 dias de gestação, a partir desse momento, a placenta começa a produzir hormônio denominado gonadotrofina coriônica equina (eCG) (BERGFELT et al., 1989). O eCG possui ação semelhante ao FSH e LH, que por sua vez, estimula o crescimento de vários folículos que podem ovular ou luteinizar, formando corpos lúteos acessórios que incrementam a produção de progesterona, a qual ajuda na manutenção da gestação até aproximadamente 150–160 dias de gestação. A partir deste momento, a placenta assume integralmente essa função (NISWENDER et al., 2002).

2.3 Reconhecimento materno da gestação

O termo “reconhecimento materno da gestação” foi nomeado por Short (1969) como eventos de sinalização do embrião inicial que resultam em resposta do sistema materno ao reconhecimento da gestação e subsequentemente aumento da vida útil do corpo lúteo (SHORT, 1969). O prolongamento da função do corpo lúteo pode ser alcançado por interceptação da luteólise, secreção de substância(s) anti-luteolítica(s), secreção de fator(es) luteotrófico(s) ou uma combinação desses mecanismos. Os eventos e o(s) fator(es) embrionário(s) que levarão ao reconhecimento materno da gestação variam entre as espécies (BAZER, 2015).

2.4 Reconhecimento da gestação em outras espécies

Os primatas humanos/não humanos e roedores mantêm a função luteal por mecanismos luteotróficos. Em primatas, o sinal de reconhecimento materno é a gonadotrofina coriônica (CG) (ROSS, 1978). As células do sinciciotrofoblasto secretam CG nos dias 8 e 10 após ovulação. Ao mesmo tempo, a implantação embrionária ocorre entre os dias 7 e 9. A gonadotrofina coriônica estimula o corpo lúteo a produzir progesterona até que ocorra uma mudança entre a secreção de progesterona lútea e placentária. Uma vez que a mudança ocorre, a secreção de gonadotrofina coriônica diminui (BAZER et al. 2010).

Em suínos o mecanismo anti-luteolítico de reconhecimento materno da gestação é mediado pelo estrogênio (BAZER & THATCHER, 1977). Em um estudo, a retirada do concepto suíno antes do dia 11 após a ovulação causou o retorno do estro, enquanto a retirada do concepto após o dia 11 a função luteal foi mantida e o intervalo do interestro foi aumentado para 25–28 dias (DHINDSA & DZIUK, 1968). Além disso, infusão de estradiol intra-uterino no dia 11 causou um efeito de luteostase do corpo lúteo (GARDNER et al., 1963). Durante o período de alongamento embrionário nos dias 10–12 (DZIUK et al., 1964), o concepto suíno produz estrogênio em grandes quantidades (ZIECIK, 2002). O estrogênio não causa diminuição na secreção de PGF do endométrio, mas redireciona a secreção de PGF da vascularização uterina para o lúmen uterino. O PGF é sequestrado e metabolizado no lúmen uterino para evitar que atinja o CL e inicie a luteólise (BAZER & THATCHER, 1977). Há também uma mudança na proporção de secreção de PGF para secreção de PGE. A secreção de estrogênio do concepto estimula a secreção de PGE₂ pelo endométrio (FRANCZAK et al., 2010), um luteoprotetor, que atua em um ciclo de feedback positivo, o que resulta em mais produção de PGE, mantendo a síntese de prostaglandinas em direção à PGE e não à PGF (WACLAWIK, 2009).

Em bovinos e ovinos o reconhecimento da gestação ocorre através de um mecanismo anti-luteolítico desencadeado pelo interferon-tau (IFNt). Em ovinos (dias 10–21) e bovinos (12–38), o IFNt é secretado pelas células trofoblásticas mononucleares do embrião (BAZER et al., 1997). O IFNt tem um efeito local e bloqueia a expressão de receptores endometriais de estrogênio α (ESR1) e ocitocina (OXTR). Devido a falta de receptores de estrogênio e ocitocina, a via de síntese de PGF é bloqueada (BAZER et al., 1997), o que resulta em pouca síntese de PGF₂ α (MEZERA et al., 2019). Também, foi sugerido que IFNt possui uma função em suportar a gestação por vias endocrinológicas, protegendo o CL contra as ações luteolíticas da PGF₂ α (HANSEN et al., 2010).

2.5 Reconhecimento materno da gestação em equinos

A espécie equina é uma das poucas espécies domésticas em que o sinal de reconhecimento materno da gestação ainda não foi identificado (SWEGEN, 2021). O reconhecimento materno da gestação em equinos foi sugerido ocorrer antes do dia 14 após ovulação, uma vez que, a luteólise em éguas ocorre por volta do dia 14 (DOUGLAS & GINTHER, 1976). Além disso, um estudo demonstrou que a transferência de embriões e subsequente gestação ocorreu em receptoras que estavam no dia 10 ou 12 do ciclo estral (WILSHER et al., 2010). Indicando, que o mecanismo anti-luteolítico em equinos deve ocorrer a partir do dia 12 após a ovulação (AURICH & BUDIK, 2015).

O concepto equino secreta pequenas quantidades de interferons (interferon δ 1 e 2 e interferon α 1), porém essas proteínas parecem não estar relacionadas com a sinalização para o reconhecimento materno da gestação, pois são secretadas após o tempo esperado da luteólise (BUDIK et al., 2010; KLEIN, 2015).

O conceito equino produz estrogênio a partir do dia 10 após a ovulação (ZAVY et al., 1979), e a produção de estrogênio aumenta com o desenvolvimento do embrião (CHOI et al., 1997). Em um estudo o prolongamento da fase lútea em éguas após infusão intrauterina com estrogênio e PGE₂, ocorreu em éguas tratadas e em éguas controle (placebo) (VANDERWALL et al., 1994). Além disso, foi demonstrado que tratamento intrauterino com estradiol no dia 14 não foi capaz de prolongar a vida lútea (WILSHER & ALLEN, 2011). Mostrando que o estrogênio possui efeitos diferentes em equinos do que em suínos.

Os receptores endometriais de estrogênio são ESR1 (ESR α) e ESR2 (ESR β). O ESR1 desempenha um papel importante nos efeitos uterotróficos do estrogênio (LUBAHN et al., 1993), enquanto a função endometrial do ESR2 ainda não está bem compreendida (REBORDÃO et al., 2017). No entanto, estudos em camundongos (WEIHUA et al., 2000) e em novilhas (DOMINGUES et al., 2020) sugerem que o ESR2 pode ter a função de inibir da ação do ESR1 no útero.

As expressões gênicas de estrogênio e P4 no endométrio de égua são estimuladas pelo estrogênio e reguladas negativamente pelo P4 (SILVA et al., 2014). Portanto, a expressão de ESR1 é maior durante o estro e baixa durante o diestro (HARTT et al., 2005; DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015). Além disso, durante a gestação em éguas, a supressão na expressão gênica de ESR1 ocorre nos dias 10 (MCDOWELL et al., 1999) e 12 (LUBAHN et al., 1993) após a ovulação.

Em um estudo, uma menor expressão gênica de ESR1 no corno uterino ipsilateral ao CL foi relatada no dia 13 em éguas gestantes (KALPOKAS et al., 2018). Os autores desse estudo sugeriram que a menor expressão do gene ESR1 no corno uterino ipsilateral ao CL poderia estar associada a um aumento unilateral na concentração de P4 no corno uterino ipsilateral ao CL e à regulação negativa da expressão do gene ESR1 poderia ter sido causado pelo P4. Contudo, nesse estudo não foram avaliadas as concentrações de P4 nos cornos uterinos ipsilateral ou contralateral ao CL.

Foi sugerido que o estrogênio pode autorregular a expressão de seu próprio receptor, tanto positivamente (ING et al., 1996) quanto negativamente (TIBBETTS et al., 1998). Portanto, diante das grandes quantidades de estrogênio sintetizadas pelo conceito equino e da observação de que o estrogênio pode ter um efeito de regular negativamente a expressão de seu próprio receptor no tecido uterino, foi levando a hipótese de que estrogênio derivado do conceito seja a causa mais provável da regulação negativa de ESR1 durante a gestação em éguas (KLEIN et al., 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram que o embrião equino produz PGE₂ e PGF₂ α (WATSON & SERTICH, 1989). Em ruminantes a secreção de prostaglandinas pelo conceito foi sugerida ser essencial para o reconhecimento materno da gestação (SPENCER et al., 2013). Contudo, outras funções da PGE₂ e PGF₂ proveniente do embrião equino além da mobilidade embrionária são desconhecidas.

Tratamento com ocitocina por infusão intravenosa durante 2 horas no diestro em éguas não gestantes estimulou pulsos de PGFM e diminuiu as concentrações circulantes de P4 (SANTOS et al., 2015). Receptores endometriais de ocitocina (OXTR) não foram diferentes entre éguas gestantes e não gestantes no dia 12 (antes da luteólise) após a ovulação (SHARP et al., 1997). Em outros estudos a expressão gênica endometrial de OXTR permanecem constantes durante o tempo esperado de reconhecimento da gestação (KLEIN et al., 2010; DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015). Mostrando que apesar da indicação de não haver uma diferença na expressão endometrial de ocitocina entre éguas gestantes e não gestantes durante o tempo esperado da luteólise, a ocitocina parece estar envolvida na regulação da cascata de produção de PGF. Futuros estudos são necessários para o entendimento da ação fisiológica da ocitocina no endométrio de éguas.

Em outras espécies como camundongos, a adesão do trofoblasto ao lúmen uterino é mediada por interações de fibronectina (proteína da matriz extracelular) e receptores de integrina, proteínas que mediam interações intercelulares e interação entre a célula e a matriz extracelular (SCHULTZ, ARMANT, 1995). O embrião equino antes do período de fixação produz fibrinogênio (KLEIN, TROEDSSO, 2011) e no dia 16 após ovulação expressa fibronectina ativando a via de sinalização da integrina (KLEIN, 2015). Portanto, foi proposto que o fibrinogênio proveniente do concepto contribuiu para a fixação do concepto pela ligação do fibrinogênio as integrinas endometriais e pode estar envolvido no mecanismo de reconhecimento materno da gestação (KLEIN, 2016).

2.6 Gestação inicial e mobilidade embrionária

Após a ovulação, o oócito é transportado para o oviduto onde ocorre a fertilização (GINTHER, 1992). Após a fertilização, o embrião equino passa do oviduto ao corno uterino por volta do dia seis (JACOB et al., 2012). Para que ocorra o transporte do embrião do oviduto para o útero, o concepto secreta prostaglandina E2 (PGE2) ao redor dos dias quatro e cinco ou quando o concepto se torna uma mórula compacta (WEBER et al., 1991). A PGE2 tem um efeito local e provoca o relaxamento do músculo liso circular no oviduto permitindo que o embrião chegue ao útero (ALLEN, 2001). Além disso, tanto o embrião (WEBER et al., 1993) quanto células musculares do oviduto (TROEDSSON et al., 1995) secretam PGF2 α , que podem estar relacionados ao transporte do embrião do oviduto para o útero.

À medida que o concepto entra no útero, ele é uma mórula em estágio tardio ou um blastocisto inicial (BETTERIDGE et al., 1982). Após a blastulação, o concepto começa a desenvolver uma cápsula sob a zona pelúcida (BETTERIDGE et al., 1982). No dia nove, há perda da zona pelúcida deixando a cápsula ao redor do concepto. A cápsula é constituída por glicoproteínas com ácido siálico constituindo a maior parte de carboidratos, que fornece ao embrião firmeza e elasticidade (KLEIN & TROEDSSON, 2011). A cápsula é essencial para a sobrevivência do embrião, pois atua como um anti-adesivo e serve como resistência contra as contrações uterinas o que facilita para mobilidade embrionária dentro do lúmen uterino (KLEIN, 2016). A cápsula começa a desaparecer no dia 22,5 e desaparece completamente no dia 24,5 (ORIOLE et al., 1993).

A mobilidade embrionária em equídeos tem sido avaliada pela divisão do útero em três segmentos imaginários de igual comprimento para o corpo do útero e para cada corno uterino. Em um exame de ultrassonografia durante a fase de mobilidade embrionária, o embrião pode estar em qualquer lugar no lúmen uterino, independentemente do lado da ovulação, desde a ponta de qualquer corno uterino até a junção do corpo do útero com a cérvix (GINTHER, 1984a). No dia 9 ou 10, o concepto já se encontra móvel por todo útero (GINTHER, 1983). O embrião permanece por mais da metade de um período diário no corpo uterino nos dias 9 e 10 (LEITH & GINTHER, 1984). Após o dia 10, a combinação embrião/útero secreta substâncias que aumentam as contrações do miométrio e mobilidade embrionária aumentam ao máximo no dia 11 ou 12 (GRIFFIN & GINTHER, 1990). No dia doze, o número de vezes que o embrião se move para os cornos uterinos aumentam e o embrião inicia uma fase de mobilidade máxima que continua até a fixação no dia 15 ou 16. O número de movimentos de um corno para outro foi estimado de 0,5 a 0,9 vezes por hora (LEITH & GINTHER, 1984; SILVA et al., 2005) (equivalente a 12–22 vezes por dia). O motivo para o aumento da entrada do embrião em um dos cornos não é conhecido, mas pode envolver maior produção de um estimulante de contração miometrial pelos embriões maiores.

Bolas esféricas cheias de água feitas a partir de luvas cirúrgicas de borracha foram inseridas no útero de éguas não gestantes nos dias 12 e 13 após a ovulação e sua localização no útero foi comparado com a movimentação do embrião em éguas gestantes. As bolas cheias de

água fizeram 50% menos mudanças de localização entre o corpo do útero e os cornos uterinos do que os embriões nos dias 12 e 13. As mudanças de localização no útero das bolas com água foram semelhantes à mobilidade de um embrião nos dias 9 e 10, indicando que contrações uterinas que já estão presentes ou algum efeito somente do útero são responsáveis por alguma mobilidade do embrião (GINTHER et al., 1985). Os resultados do estudo mencionado acima também indicam que após o dia 10 o embrião ou o útero secretam substâncias que estimulam as contrações do miométrio.

Um aumento na perfusão vascular endometrial acompanha o embrião móvel à medida que ele se move de um corno uterino para outro corno uterino. O escore de vascularização endometrial e o número de pixels coloridos são maiores no corno uterino com embrião do que no corno uterino oposto ao embrião nos dias 12–15 (SILVA et al., 2005). Foi demonstrado que ligadura cirúrgica na base dos dois cornos uterinos para evitar a migração do embrião por todo útero resulta em luteólise (MCDOWELL et al., 1988) e aumenta o tônus uterino e a contratilidade no corno uterino com o embrião, mas não no corno uterino que não está exposto ao embrião (GRIFFIN et al., 1993). Além disso, as contrações do corpo uterino diminuem 55 minutos após o embrião deixar o corpo uterino (GRIFFIN & GINTHER, 1993). Esses estudos demonstraram um efeito intrauterino local do embrião na prevenção da luteólise e na alteração das características uterinas, incluindo a estimulação local das contrações uterinas e do fluxo sanguíneo endometrial.

A mobilidade embrionária de gestação gemelar (dois embriões) foi comparado com gestação única (um único embrião) em éguas Quarto de Milha. Os embriões individuais das gestações gêmeas apresentaram padrões de mobilidade semelhantes aos dos embriões de gestação única. A maior permanência dos embriões menores no corpo do útero e o aumento da permanência dos embriões com diâmetro maior nos cornos uterinos foi semelhante entre os embriões de gestações gêmeas e únicas. A maioria (64%) das mudanças de localização dos embriões gêmeos ocorreu de forma independente, apoiando a hipótese de que o embrião desempenha um papel ativo na sua mobilidade (GINTHER, 1984b).

Em um estudo envolvendo a síntese de prostaglandina no concepto equino no dia 12 após a ovulação, foi especulado que a secreção de PGE2 e PGF2 α ocorre em pólos (esquerdo e direito) diferente do embrião, o que poderia explicar o movimento da vesícula em uma determinada direção (BUDIK et al., 2021).

O tratamento *in vivo* de PGE2 por via intrauterina ou via intravenosa no dia 12 (GASTAL et al., 1998), assim como, tratamento com PGF2 α *in vitro* (RIBGY et al., 2001) no dia 12, estimulam as contrações miométrias. O tratamento com PGE2 e PGF2 α intramuscular durante o diestro aumenta a atividade elétrica do miométrio (TROEDSSON et al., 1995). Por outro lado, a mobilidade do embrião associado com diminuição das contrações uterinas é diminuída com clenbuterol (LEITH & GINTHER, 1985) e anti-inflamatórios não esteroides (STOUT & ALLEN, 2002). A PGE2 produzida *in vitro* pelo embrião equino liga-se ao tecido endometrial de éguas não gestantes nos dias 11–15 (VANDERWALL et al., 1993). No entanto, o fluido uterino coletado nos dias 14 e 16 em éguas gestantes contém PGE2, mas não PGF2 α (STOUT & ALLEN, 2002), indicando que a PGE2 seja o principal estimulador da mobilidade do embrião.

Devido à presença de um concepto móvel, as concentrações de PGF no plasma da via uterina são menores em éguas gestantes do que em éguas não gestantes no dia 14 após a ovulação (DOUGLAS & GINTHER, 1976). Lavados uterino de éguas gestantes nos dias 14–16 contém PGF2 α com concentração inferior do que lavado uterino de éguas não gestantes no mesmo período (BERGLUND et al., 1982), além disso, lavados uterino no dia 18 em éguas gestantes contém concentrações similares de PGF2 α às observadas durante o luteólise em éguas não gestantes (STOUT & ALLEN, 2002). Estudo *in vitro* demonstrou que o endométrio de éguas gestantes é capaz de produzir PGF2 α (PIOTROWSKA-TOMALA et al., 2020). Por tanto,

resultado dos estudos mencionado acima, indicam que o embrião não impede a produção de PGF2 α por completo.

A cessação da mobilidade do concepto em éguas ocorre ao redor do dia 16 após a ovulação e é denominada com fixação. O momento da fixação pode ser observado quando o embrião não deixa o local de fixação após 2 horas (GRIFFIN & GINTHER, 1993). O aumento do diâmetro do embrião, aumento do tônus uterino e diminuição do diâmetro dos cornos uterinos apresenta um impedimento físico à mobilidade embrionária e favorecem para seleção do local de fixação. O local da fixação é quase sempre na flexura caudal de um dos cornos uterinos. Contudo, fixação do embrião no seguimento médio ou no ápice do corno uterino foi demonstrado como casos isolados (GASTAL et al., 1996).

A perda do ácido siálico na cápsula coincide com a cessação da mobilidade do embrião (ORIOLE et al., 1993). Uma enzima (sialidase 2 - NEU2) precursora do ácido siálico é expressada pelo concepto equino com níveis aumentados nos dias oito ao dia dezesseis após a ovulação. A expressão da proteína NEU2 é detectável no trofoblasto e na capsula do embrião, mas não pelo endométrio (KLEIN & TROEDSSON, 2012). Portanto, parece que o concepto regula a própria produção de ácido siálico pela expressão da enzima NEU2 e o ácido siálico parece ser essencial para regulação da fixação embrionária.

2.7 Síntese de prostaglandina no endométrio

Em éguas a secreção de PGF ocorre a partir de células endometriais que depende de uma regulação de hormônios esteroides e da regulação positiva na expressão de seus receptores (HARTT et al., 2005). Durante a fase lútea (dia 14) receptores endometriais de P4 são negativamente regulados resultando na regulação positiva de receptores de estrógeno (ESR) e subsequentemente na regulação positiva de receptores endometriais de ocitocina (OXTR). Além disso, estrógeno estimula pulso de ocitocina proveniente do hipotálamo (MCCRACKEN et al., 1999).

Após a regulação positiva de receptores endometriais de ocitocina, esta se liga a seu receptor aumentando o transporte intracelular de Ca²⁺ estimulando a atividade da fosfolipase A2 (PLA2). A fosfolipase A2 aumenta a produção de diacilglicerol e ativação da proteína Kinase C e conduz para mobilização do ácido araquidônico (AA), que é o primeiro precursor da PGF (MCCRACKEN et al., 1999). Em éguas a atividade da PLA2 no endométrio aumenta durante o final do diestro, enquanto durante a gestação sua atividade diminui devido a presença de um concepto (ABABNEH & TROEDSSON, 2012). O aumento da atividade da PLA2 coincide com o período do ciclo estral onde o endométrio tem uma capacidade aumentada para secretar prostaglandinas e a síntese de PGF2 α parece ser regulada, em parte, pela atividade endometrial da PLA2. Entretanto, durante o dia 22 após a ovulação, existe um incremento da expressão de PLA2 que pode indicar o reinício da secreção de PGF2 α nessa fase da gestação (OZEL et al., 2014).

A prostaglandina-endoperoxide sintase 1 (PTGS1) e prostaglandina-endoperoxide sintase 2 (PTGS2) convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H2 (PGH2). O PTGS1 e PTGS2 também são conhecidos com o COX1 e COX2 (NEEDLEMAN et al., 1986). A avaliação na expressão gênica endometrial durante dias envolvendo a luteólise demonstrou uma maior expressão de PTGS2 em éguas não gestantes do que em éguas gestantes (ATLI et al., 2010). Além disso, cultivos de implantes endometriais mostrou que as secreções provenientes do concepto reduzem a expressão de PTGS2 e a liberação de PGF2 α , indicando que regulação negativa na expressão endometrial de PTGS2 em éguas gestantes (EALY et al., 2010). A PGH2 é convertida em prostaglandina E2 (PGE2) ou em PGF2 α pela enzima PGE sintase (PTGES) e PGF sintase (PTGFS), respectivamente (NEEDLEMAN et al., 1986).

Em éguas, a PGF secretada pelas células endometriais chega aos ovários por via sistêmica, diferente de outras espécies como a bovina em que a veia uterina e artéria ovariana formam uma única estrutura e uma rota uterolútea unilateral (GINTHER, 1981). Um membro da família do transportador de ânion orgânico portador de soluto 2A1 (SLCO2A1) facilita o transporte de PGF através da membrana plasmática endometrial, células luteais e células epiteliais alveolares nos pulmões (AROSH et al., 2004). Nos pulmões a PGF é metabolizada pela enzima 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD) (SHRESTHA et al., 2012).

Tratamento com dose luteolítica (250 µg) de cloprostenol, um análogo de PGF que não é metabolizado em PGFM, estimulou a produção *in vivo* de PGF pelo aumento da concentração circulante de PGFM e em *in vitro* células endometriais aumentaram a produção de PGF pelo tratamento com PGF. Indicando que a produção endometrial de PGF pode ocorrer por um mecanismo de auto-amplificação, onde a PGF estimula a produção de PGF (KOZAI et al., 2016).

2.8 Ultrassonografia

O aparelho de ultrassonografia produz ondas sonoras de alta frequência que não são audíveis ao ser humano (GOLDSTEIN, 2006). Essas ondas são produzidas por vibração de cristais piezoelétricos presentes no transdutor, que interagem com os tecidos onde podem ser refletidas, refratadas ou absorvidas. As ondas que retornam ao transdutor formam as imagens de acordo com a impedância acústica do tecido, sendo que na ultrassonografia modo-B, as imagens são produzidas em escala de cinza (GINTHER, 1995a).

Fundamentalmente, o som é uma onda mecânica de forma longitudinal, que se propaga de modo circunscrito nos meios sólido, líquido ou gasoso, por possuir massa e elasticidade, não se propagando no vácuo. Com base no fato de que as ondas sonoras não são ionizantes e, portanto, inócua aos seres vivos, têm sido usadas amplamente para fins de diagnóstico, terapêuticos e de pesquisas que envolvem tanto animais de grande e pequeno porte (GOLDSTEIN, 2006).

2.8.1 Ultrassonografia Doppler colorido

Em 1842, o pesquisador austríaco Johann Christian Doppler descreveu o efeito Doppler como a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto que se encontra em movimento em relação ao observador (HOUSTO, 1989). Quando a fonte de onda e o objeto que recebe a onda estão estacionários, a frequência de onda é constante. No entanto, se a fonte de onda estiver movendo-se para perto ou longe do objeto, a frequência de onda diminui ou aumenta, respectivamente. Quando o efeito Doppler é utilizado na ultrassonografia, o observador estático é o transdutor e o objeto em movimento são as células sanguíneas (hemácias), que refletem as ondas ultrassonográficas emitidas pelo transdutor. A frequência das ondas refletidas varia de acordo com a velocidade e sentido do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

A ultrassonografia Doppler é uma técnica não invasiva com resultado em tempo real, sendo a via transretal utilizada para avaliação do sistema reprodutivo nos animais de grande porte (FERREIRA et al., 2011). Essa técnica é efetiva e útil para a avaliação *in vivo*, possibilitando uma acurácia no diagnóstico de patologias, monitoração dos eventos reprodutivos e no estudo da capilaridade das estruturas, assim como, dos órgãos do sistema reprodutor (GINTHER & UTT, 2004), ainda podendo prever condições futuras dos eventos reprodutivos (GINTHER, 2007).

A técnica de ultrassonografia Doppler é dividida em dois modos: Doppler colorido e espectral ou pulsado. Ambos os modos são utilizados com o objetivo de avaliar a perfusão

sanguínea, a escolha de qual modo utilizar dependendo do tecido a ser estudado (GINTHER, 2007; FERREIRA et al., 2011).

2.8.2 Modo espectral

Pelo modo espectral se analisa o fluxo sanguíneo de um vaso específico de forma quantitativa, onde a velocidade do fluxo sanguíneo é representada por um gráfico em forma de onda denominado spectrum, representando cada onda um ciclo cardíaco completo. O spectrum promove informação de valores como velocidade de pico sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV) e velocidade máxima média (TAMV). Por esse modo é possível também identificar a direção do fluxo sanguíneo. A formação da onda abaixo da linha base do monitor é considerada fluxo em direção oposta ao transdutor. Portanto, formação da onda acima da linha de base do monitor é considerada fluxo em direção ao transdutor (FERREIRA et al., 2011).

A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral é feita por imagem do modo-B ou do modo colorido, pela colocação do cursor (Gate) no lúmen do vaso sanguíneo. Deve ser formada uma angulação entre o cursor e o lúmen do vaso, denominado ângulo de insonação ou ângulo Doppler (GINTHER, 2007). Portanto, recomenda-se a utilização de um ângulo de 30° a 60° entre o cursor e o vaso sanguíneo (GINTHER & UTT, 2004).

No entanto, devido à grande tortuosidade das artérias presentes no mesométrio, ovários e útero, não é possível determinar os seus respectivos ângulos Doppler. Uma alternativa usada para avaliar esses vasos tortuosos é pelo índice Doppler, que consiste em índice de resistência vascular (RI) e o índice de pulsatilidade (PI) (SILVA et al., 2005). Esses índices são indicadores precisos da perfusão vascular e são obtidos independentemente do ângulo de insonação. Ambos RI e PI apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, ou seja, quanto menores RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido pelo determinado vaso. O PI é indicado nos casos em que o fluxo é ausente ou praticamente ausente durante a diástole. O RI deve ser usado nos casos em que ocorre um fluxo vascular contínuo durante a diástole. (GINTHER et al., 2007c).

2.8.3 Modo Doppler colorido

O modo Doppler colorido promove uma avaliação do fluxo sanguíneo de diferentes órgãos e tecidos. Diferente do modo espectral, o modo Doppler colorido é um método de avaliação simples, rápido e funcional, não dependendo do ângulo Doppler. Este modo ainda é subdividido em: Modo Color-Flow e Power-Flow (GINTHER, 2007).

O modo Color-Flow promove a imagem em duas cores, normalmente variando entre azul e vermelho, representando a perfusão vascular sanguínea da estrutura e a direção do fluxo sanguíneo. Onde, pixels vermelhos indicam que o fluxo sanguíneo está indo em direção ao transdutor, enquanto pixels na cor azul indica que o fluxo sanguíneo está indo em direção oposta ao transdutor (GINTHER, 2007).

No modo Power-Flow, o movimento do fluxo sanguíneo é graduado utilizando uma única cor e a intensidade de cores de pixel varia de acordo com a força de sinal do Doppler (FERREIRA et al., 2011). Segundo Ginther (2007), imagens geradas através do modo Power-Flow possui maior sensibilidade para um fluxo sanguíneo fraco. Também, o modo Power-Flow é o modo indicado para avaliação de vasos com pequenos diâmetros, com pouco fluxo sanguíneo, vasos presentes no útero (mesométrio, endométrio e miométrio) e no ovário (mesovário, corpo lúteo e parede folicular).

A avaliação da vascularidade da estrutura em ambos os modos (Color-Flow e Power-Flow) é feita pela quantificação da extensão da área do tecido com pixels coloridos que pode

ser realizada por forma objetiva e subjetiva. Na avaliação objetiva, uma imagem com vascularização máxima é escolhida e os pixels coloridos são contados por um programa de computador, fornecendo um valor quantitativo da perfusão. Já a avaliação subjetiva, se dá pela avaliação pelo olho do operador (ou operadores), sendo em tempo real ou de imagens gravadas, em que, escores de avaliação são dados para a vascularização mínima (1) à máxima (4), ou uma nota da porcentagem (0 – 100%) dos pontos de pixels com relação a periferia do CL. Ambos os métodos (objetivo ou subjetivo) parecem ser eficientes (GINTHER, 2007).

3 CAPÍTULO I. CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA E METABÓLITO DE PGF₂ α DURANTE O PERÍODO INTEROVULATÓRIO EM ÉGUAS NÃO GESTANTES COMPARADO COM OS MESMOS DIAS CORRESPONDENTES EM ÉGUAS GESTANTES

T. Castro^{a,b,c}, J.C. Jacob^a, G. Stefani^a, R.R. Domingues^{b,c}, O.J. Ginther^{b,c,*}

^aDepartamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

^bEutheria Foundation, Cross Plains, Wisconsin 53528, USA

^cDepartment of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706, USA

*Correspondente: Tel.: +1 608 798 3777;
E-mail address: oj.ginther@wisc.edu (O.J. Ginther)

3.1 RESUMO

As concentrações de progesterona (P4) e de um metabólito de PGF2 α (PGFM) foram comparadas entre o período interovulatório de éguas não gestantes (n = 8) e os correspondentes dias em éguas gestantes (n = 9). A hipótese 1 foi de que as concentrações diárias de PGFM aumentam na interseção entre o final do aumento de P4 e a diminuição gradual de P4 (~ dia 6) em éguas não gestantes. A hipótese 2 foi de em que éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias correspondentes aos pulsos de alta amplitude na luteólise em éguas não gestantes. Em amostras de sangue diárias, a P4 aumentou entre o dia da ovulação (dia 0) até ~ dia 6 e, em seguida, diminuiu gradualmente nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes até o início da luteólise no grupo éguas não gestantes. Antes do início da luteólise, não houve diferença significativa nas concentrações de P4 entre os grupos de éguas não gestantes e éguas gestantes. No grupo de éguas não gestantes, a concentração de PGFM aumentou ($P < 0,04$) no dia anterior ao início da luteólise e atingiu uma média máxima ($42,9 \pm 11,6$ pg/mL) no dia 14. No grupo de éguas gestantes, um aumento nas concentrações de PGFM ocorreu a partir do dia 12 com uma média máxima no dia 15 ($16,7 \pm 3,1$ pg/mL). As concentrações diárias de PGFM não foram diferentes entre os dois grupos até o aumento imediatamente de PGFM antes da luteólise no grupo de éguas não gestantes. Durante as sessões de 8 horas de coleta de sangue por hora, as concentrações média e máxima de PGFM foram significativamente maiores no grupo éguas não gestantes do que no grupo éguas gestantes para cada sessão de 8 horas nos dias 13, 14 e 15. O valor da concentração mínima de PGFM não foi diferente entre os grupos em qualquer um dos dias. Os pulsos de PGFM foram identificados pelo coeficiente de variação durante as sessões de coletas de hora em hora por 8 horas nos dias 4–7, 9–11 e 13–16. Apesar do aumento de PGFM nas amostras diárias entre os dias 12 e 15 no grupo de éguas gestantes, a amplitude e os picos dos pulsos identificados por CV não diferiram entre as séries de três dias. Os pulsos foram igualmente pequenos para as séries do dia 4–7 e 9–11 no grupo de éguas não gestantes e para todas as séries no grupo de éguas gestantes (4–7, 9–11 e 13–16). A hipótese 1 não foi suportada de que as concentrações diárias de PGFM têm um aumento nas éguas não gestantes durante a interseção entre o final do aumento rápido de P4 e a diminuição gradual de P4 (~ dia 6). A hipótese 2 foi suportada em que éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias de pulsos de alta amplitude na luteólise em éguas não gestantes.

Palavras-chave: luteólise, corpo lúteo, gestação, PGFM, ultrassonografia.

3.2 ABSTRACT

The concentrations of progesterone (P4) and a metabolite of PGF2 α (PGFM) in mares were compared between the interovulatory interval (IOI; n = 8) and the corresponding days of pregnancy (n = 9). In daily blood samples, P4 increased between the day of ovulation (day 0) and ~ day 6 and then gradually decreased until the beginning of luteolysis in the IOI group. Before the beginning of luteolysis, there were no significant differences in P4 concentrations between the IOI and early pregnancy. In the IOI, PGFM concentration on the day before the beginning of luteolysis began to increase ($P < 0.04$) and reached a maximum mean (42.9 ± 11.6 pg/mL) on day 14. In pregnancy, a novel increase in PGFM occurred from day 12 to a maximum mean on day 15 (16.7 ± 3.1 pg/mL). Daily PGFM concentrations were not different between the two groups until the increase just before luteolysis in the IOI. During 8-h sessions of hourly blood sampling, the mean and maximum PGFM concentrations were significantly greater in IOI than in pregnancy for each 8-h session on days 13, 14, and 15. The minimum was not different between groups on any day. Pulses of PGFM were identified by coefficient of variation during the hourly 8-h sessions on day-sets of days 4–7, 9–11, and 13–16. Despite the PGFM increase in daily samples between days 12 and 15 of pregnancy, the amplitude and peaks of CV-identified pulses did not differ in the pregnant mares among the three day-sets. The pulses were similarly small for day-sets 4–7 and 9–11 in the IOI and for all day-sets in pregnancy (eg, amplitude on days 13–16: 43.4 ± 15.6 pg/mL vs 5.4 ± 1.1 pg/mL for IOI vs pregnancy). Hypothesis 1 was not supported that daily PGFM concentrations in an IOI increase at the intersection between the end of the rapid P4 increase and the gradual P4 decrease. Hypothesis 2 was supported that pregnant mares have low amplitude PGFM pulses during the days of the high amplitude pulses at luteolysis in the IOI.

Keywords: luteolysis, corpus luteum, PGFM, pregnancy, ultrasound.

3.3 INTRODUÇÃO

Concentrações circulantes de progesterona (P4) durante o período interovulatório (período entre duas ovulações) em éguas têm sido revisado especialmente em comparação com a luteólise (GINTHER, 2009; STOUT, 2009; MCDOWELL & SHARP, 2011). Análises laboratoriais sobre a concentração circulante de P4 (STABENFELDT et al., 1972; SHARP & BLACK, 1973) e LH (WHITMORE et al., 1973) durante o período interovulatório em éguas foram reportados durante o início dos anos 1970. Nos anos subsequentes, a relação recíproca entre as concentrações de P4 e LH foi esclarecida com base na amostragem de sangue a cada 24 horas (GINTHER et al., 2006; GINTHER et al., 2016b) e a cada 4 horas (GINTHER et al., 2007c) durante todo período interovulatório. Do dia 0 (dia da ovulação) ao dia 6, P4 rapidamente aumenta e LH diminui a partir do dia 1. Concentrações de P4 diminuem gradualmente após os dias 6–8 e diminuem rapidamente no início da luteólise por volta do dia 13 (GINTHER et al., 2006; SANTOS et al., 2015a; GINTHER et al., 2016a; GINTHER et al., 2016b). Durante a diminuição gradual de P4, LH também diminui e começa a aumentar cerca de um dia antes do final da luteólise ($P4 < 1 \text{ ng/mL}$) (GINTHER et al., 2006).

As concentrações de P4 parecem ser semelhantes entre o período interovulatório em éguas não gestantes e em éguas gestantes até o início de luteólise em éguas não gestantes (BERGFELT & GINTHER, 1996; WILLMANN et al., 2011; FERREIRA et al., 2019). As concentrações de P4 diminuem bruscamente durante a luteólise e nas éguas gestantes parecem continuar a diminuir gradualmente por cerca de mais uma semana. A possível diminuição gradual de concentrações de P4 em éguas gestantes após o dia 14 permanece aproximadamente constante até um aumento por volta do dia 35. O aumento nas concentrações circulantes de P4 é a partir da continuação do CL primário e formação de CL assessoriais em resposta à produção de gonadotrofina coriônica equina (eCG) pelos cálices endometriais (SQUIRES et al., 1974a; SQUIRES et al., 1974b; ALLEN, 2001). A produção contínua de P4 durante a gestação causa quiescência miometrial (ALLEN, 2009) e é essencial para a sobrevivência embrionária (STOUT, 2016).

Na década de 1960 e início dos anos de 1970, relatos em várias espécies incluindo equinos (GINTHER & FIRST, 1971; STABENFELDT et al., 1974) indicam que o útero produz um fator luteolítico que favorece para luteólise. Na década de 1970, foi demonstrado que a $PGF2\alpha$ é responsável pela luteólise em várias espécies. No estudo inicial em éguas, um único tratamento com uma forma natural de $PGF2\alpha$ encurtou a duração do diestro (DOUGLAS & GINTHER, 1972). A presença de PGF no sangue de éguas foi primeiramente determinado a partir de sangue retirado da veia uterina em intervalos de 4 dias (DOUGLAS & GINTHER, 1976). Aos 14 dias após ovulação, a concentração de PGF foi maior em éguas não gestantes do que em éguas gestantes. Por causa da meia vida curta do $PGF2\alpha$ (SHRESTHA et al., 2012), seu metabólito (PGFM) foi usado pela primeira vez em 1979 para representar as concentrações de $PGF2\alpha$ em éguas (NEELY et al., 1979); concentrações elevadas foram encontradas durante a luteólise. Outros estudos sobre as concentrações circulante de PGFM em éguas gestantes foram baseados em amostras coletadas infrequente ou muito tarde durante a gestação (HALUSKA & CURRIE, 1988; TSUMAGARI et al., 1991) para a atual área de interesse. As concentrações de $PGF2\alpha$ em éguas também foram demonstradas em lavado uterino, incubação de tecido endometrial e em membranas do concepto (SHARP et al., 1984; STOUT & ALLEN, 2002). A $PGF2\alpha$ é transportada do útero para o ovário ipsilateral ao CL por uma rota sistêmica em éguas (GINTHER & FIRST, 1971; STABENFELDT et al., 1974; GINTHER, 1998), contrastando com uma rota uterolútea unilateral em várias outras espécies.

Em éguas, pulsos de PGFM foram caracterizados durante o período interovulatório (GINTHER et al., 2008b), durante a hora de transição para a luteólise (GINTHER & BEG,

2011; GINTHER & BEG, 2012b), e durante a luteólise (GINTHER & BEG, 2009; GINTHER et al., 2011a; GINTHER & BEG, 2012a). Um aumento nas concentrações de PGFM foi relatado durante o dia 6 juntamente com o início da diminuição gradual nas concentrações de P4 (GINTHER et al., 2016b). A hora de transição no início da luteólise é caracterizada por um pequeno pulso de PGFM semelhante em amplitude aos pulsos pré-luteolíticos anteriores a luteólise (GINTHER & BEG, 2011; GINTHER & BEG, 2012b). Durante a luteólise (GINTHER et al., 2011a), os pulsos de PGFM são mais proeminentes e ocorrem a cada 9 horas. Apesar dos vários estudos sobre pulsos de PGFM durante o período interovulatório, nenhum estudo foi encontrado sobre pulsos de PGFM em éguas gestantes durante ao período correspondente a luteólise em éguas não gestantes. Concentração de PGFM e pulsos de PGFM foram comparados recentemente entre o período interovulatório e a gestação inicial em novilhas (PINAFFI et al., 2018) e vacas (MEZERA et al., 2019). Durante a luteólise esperada em bovinos, a concentração basal de PGFM foi semelhante entre os grupos e a amplitude dos pulsos de PGFM foram mais baixos no grupo com animais gestantes do que no grupo dos animais não gestantes. Estudo semelhante aparentemente não foi feito em éguas.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar as relações entre as concentrações de P4 e concentrações de PGFM e pulsos de PGFM durante o período interovulatório de éguas não gestantes e comparar com os dias correspondentes em éguas gestantes. As concentrações de P4 e PGFM foram avaliadas diariamente nos dias 0–18 em éguas não gestantes e nos dias 0–24 em éguas gestantes. Os pulsos de PGFM foram caracterizados em intervalos de uma hora, durante 8 horas. A hipótese 1 foi que há um aumento nas concentrações diárias de PGFM durante a interseção entre o final do pico de P4 e o início da diminuição de P4 ao redor do dia 6; hipótese baseada em uma observação inesperada relacionada ao aumento nas concentrações diárias de PGFM no dia 6 em éguas não gestantes (GINTHER et al., 2016b). A hipótese 2 foi que em éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias correspondente aos dias de luteólise em éguas não gestantes; hipótese foi baseada nos resultados de estudos em novilhas (PINAFFI et al., 2018) e vacas (MEZERA et al., 2019).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Local

O experimento foi conduzido no Setor de Equinos (Matrizes), na Área de Reprodução Animal (ARA) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, município de Seropédica – RJ, latitude: 22°44'38", longitude: 43°42'27".

As análises hormonais foram realizadas no laboratório do Departamento de Ciências Patobiológicas da University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, no norte dos Estados Unidos da América, latitude: 43°4'22.98", longitude 89°24'4.42".

3.4.2 Animais e inseminação

Foram utilizadas 18 éguas não lactantes da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 4–15 anos, pesando entre 370–450 quilos. As éguas foram mantidas sob luz natural em piquetes coletivo com capim grama estrela e acesso a sal mineral e água.

Todas as éguas permaneceram saudáveis e com bom estado de condição corporal, segundo a escala de Henneke et al. (1983). Anormalidades do trato reprodutivo incluindo fluido durante o diestro (indicador de endometrite) (GINTHER, 1986; ADAMS et al., 1987) não

foram detectados por avaliação ultrassonográfica transretal. Além disso, éguas que apresentaram dupla ovulação ou que ovularam durante o diestro não foram utilizadas.

Os animais foram utilizados a partir do segundo período interovulatório da estação de monta, ou seja, a partir da segunda ovulação. As éguas foram tratadas de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo CEUA número 022-10-2018-CEUA).

Éguas em diestro, indicado pela presença de um CL ativo, foram tratadas com 5 mg de PGF2 α (dinoprost trometamina, Lutalyse, Zoetis, SP, Brasil) e posteriormente avaliadas diariamente até um folículo pré-ovulatório de pelo menos 35 mm e um escore ecotextural endometrial de 3 ou 4 (GINTHER & PIERSON, 1984; GINTHER et al., 1986). Em seguida, todas as éguas foram induzidas a ovular por administração intravenosa de 1000 UI de hCG (Vetecor, Hertape Calier®). A inseminação artificial foi realizada com sêmen fresco (20–30 mL, contendo um total de 500×10^6 células de espermatozoides com motilidade progressiva) diluído na proporção 1:1 de diluente de sêmen (Botusemen®; Botupharma, Brasil) 24 horas após a indução da ovulação. Foi utilizado sêmen de um garanhão com fertilidade comprovada. A ovulação foi determinada uma vez por dia entre as 8:00 e as 9:00 horas da manhã, e o dia da ovulação foi designado como dia 0. O diagnóstico de gestação foi feito por imagem ultrassonográfica no dia 12.

3.4.3 Delineamento experimental e coleta das amostras

Os animais do experimento foram divididos em dois grupos: éguas gestantes ($n = 9$), éguas que ficaram gestantes após a inseminação e éguas não gestantes, éguas que não foram inseminadas ($n = 9$). Avaliação ultrassonográfica por via transretal e coleta de amostras de sangue por via intravenosa foram realizadas a cada 24 horas desde o dia 0 até a próxima ovulação no grupo égua não gestantes e até o dia 24 no grupo éguas gestantes (Figura 2). Amostras de sangue diárias foram coletadas às 8:30 horas da manhã de cada dia e analisadas para P4 e PGFM. Além disso, amostras de sangue foram coletadas de hora em hora durante 8 horas em cada um dos dias 4–7, 9–11 e 13–16 para detecção e caracterização de pulsos de PGFM. Avaliações por imagens ultrassonográficas foram utilizadas para determinar o dia da ovulação, presença de CL e prenhez. Foi utilizado um equipamento de ultrassom (Mindray Z5-Vet; Mindray North America, Mahwah, NJ, EUA) equipado com um transdutor transretal linear de 7,5 MHz.

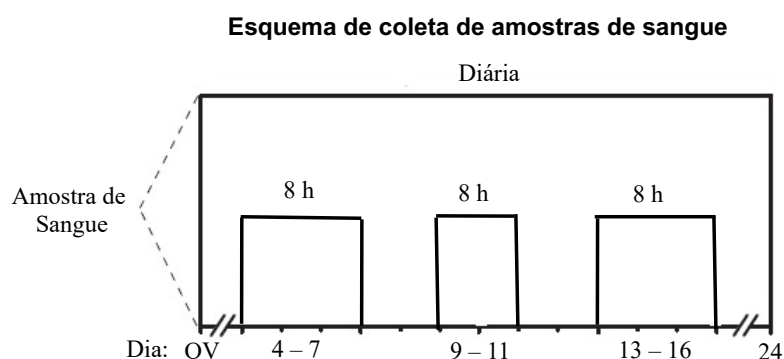


Figura 2. Esquema de coleta de amostras de sangue. As amostras foram coletadas a cada 24 horas desde o dia 0 (ovulação) até a próxima ovulação no grupo égua não gestantes e até o dia 24 no grupo éguas gestantes, adicionalmente as amostras diárias, foram coletadas amostras de hora em hora durante 8 horas em cada um dos dias 4–7, 9–11 e 13–16. 8 h, coleta de hora em hora durante 8 horas; OV, dia da ovulação.

As concentrações máximas diárias de P4 e PGFM foram normalizadas para o início e o final da luteólise, conforme indicado por um declínio rápido ininterrupto em P4. Uma diminuição diária ininterrupta $\geq 20\%$ da concentração P4 comparado com o dia anterior foi definido como o dia de início da luteólise (dia 0B) e o primeiro dia em que a concentração de P4 diminuiu para $< 1,0$ ng/mL foi definido como o fim da luteólise (dia 0E) (GINTHER et al., 2011a). Além disso, os dados foram também normalizados para o dia de máxima concentração de PGFM, definido como dia 0M.

3.4.4 PGFM

As comparações entre grupos (éguas não gestantes e éguas gestantes) durante as sessões de 8 horas de amostragem por hora nos dias 4–7, 9–11 e 13–16 foram as concentrações médias, máximas e mínimas de PGFM e número de pulsos de PGFM.

Um pulso de PGFM foi definido por um coeficiente de variação (CV) três vezes maior do que o valor médio do intra-ensaio CV dos valores composto de no mínimo quatro valores (quatro horas) ascendentes e descendentes. As características dos pulsos de PGFM (Nadir 1, amplitude, pico, nadir 2, intervalo entre nadir 1 ao nadir 2 e área sob a curva) foram determinados para todos os pulsos e para o pulso mais proeminente em cada conjunto de dias (dias 4–7, 9–11, 13–16). O pulso mais proeminente durante cada conjunto de dia (dias 4–7, 9–11, 13–16) também foi comparado entre os conjuntos do dia para as horas -2 a 2 (hora 0 = hora do pico).

3.4.5 Análises hormonais

As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e submergidas imediatamente em água a 0 °C por no mínimo de 10 min, seguido de centrifugação ($2.000 \times g$ por 10 minutos). O plasma foi armazenado (-20 °C) até envio ao laboratório. As amostras foram transportadas ao laboratório para as análises hormonais por via aérea durante 26 horas em caixa térmica contendo gelo seco. Todas as amostras permaneceram congeladas durante o transporte. Após a chegada das amostras no laboratório, elas foram armazenadas (-20 °C) até a realização das análises. As amostras foram transportadas contendo documentos de importação e exportação de material biológico de origem animal emitidos pelo Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Service vinculado ao Department of Agriculture (USDA) dos Estados Unidos da América. O transporte das amostras também seguiu as normas de segurança estabelecida da companhia aérea.

As concentrações de progesterona de cada amostra foram determinadas usando um kit de radioimunoensaio de fase sólida contendo tubos revestidos com anticorpos e progesterona (RIA; ImmuChem Coated Tube Progesterone ^{125}I RIA kit, MP Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA). As soluções com padrões de P4 fornecidos pelo kit ($40-0,1$ ng/ml) e as amostras de plasma a serem analisadas foram pipetadas (100 μl) para tubos revestidos com anticorpo. O marcador de progesterona (1 ml) foi adicionado a cada tubo e os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos e incubados em banho-maria a 37 °C por 2 horas. Os tubos foram decantados, cuidadosamente drenados e as concentrações de P4 foram contadas por 1 minuto em um contador Gama. Os valores de CV do intra-ensaio e sensibilidade foram 5.0% e 0.04 ng/ml, respectivamente.

As concentrações de PGFM foram medidas por meio do teste de ELISA baseado em um método desenvolvido para bovinos (GINTHER et al., 2007b) e adaptado para éguas (GINTHER & BEG, 2012b). As placas foram revestidas com IgG anti-coelho de cabra (4050-01, Southern Biotech, Birmingham, AL, EUA) (solução estoque 2 $\mu\text{g/ml}$ diluído 1:1000 em um tampão de carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6), e deixado durante a noite (16 horas) em

geladeira a 4 °C. As soluções padrões de 9,8 a 625 pg/ml foram preparadas em plasma livre de prostaglandina de éguas tratadas com flunixin meglumine (GINTHER et al., 2007b). Todas as amostras e soluções padrões foram ajustados para pH < 3 com ácido clorídrico a 3M, e 250 µl da amostra foram combinados com éter dietílico (2 ml), agitados em vórtex por 3 minutos, e os frascos foram submergidos em uma solução de metanol com gelo seco para congelar a camada aquosa. Posteriormente, o éter foi evaporado à temperatura ambiente durante a noite e 250 µl de solução tampão de ensaio foram adicionados para suspender novamente o material extraído. As amostras foram então colocadas em um agitador de placas por uma hora. A placa de ELISA revestida foi lavada quatro vezes, o anticorpo primário foi adicionado (diluição 1:16.000) e a placa foi colocada novamente em um agitador por 1,5 h em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada quatro vezes, e 100 µl das amostras foram adicionados em duplicata aos poços da placa e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente antes da adição de 50 µl do conjugado PGFM-HRP (diluição 1:20.000). Após 1 h de incubação em temperatura ambiente, a placa foi lavada quatro vezes e 125 µl de solução de substrato foram adicionados. A cor se desenvolveu por 15 min e a reação foi interrompida com 50 µl de ácido sulfúrico a 0,5 M antes que a densidade óptica fosse lida nos comprimentos de onda de 450 e 600 nm. O CV intra-ensaio e interensaio foi de 6,2% e 11,7%, e a sensibilidade foi de 1.1 pg/ml, respectivamente.

3.4.6 Análise estatística

Os dados que não foram distribuídos normalmente na base do teste de Shapiro-Wilk foram resolvidos por transformação de logaritmos naturais ou por ranqueamento. Os dados foram processados pelo sistema de análise estatística (SAS) PROC MIXED com repetições para minimizar as autocorrelações entre medidas sequenciais (versão 9.4; SAS Institute Inc., Cary NC, EUA). Foi levado em consideração os efeitos principais de grupo e tempo (dia e hora) e da interação entre grupo a tempo. Quando um fator foi significativo, o teste de Tukey foi utilizado para comparações entre os grupos e entre os tempos. O teste t também foi usado em uma base preliminar ou provisória para comparações de interesse especial quando uma interação não foi significativa. A probabilidade de $P < 0,05$ indicou que a diferença foi significativa, e a probabilidade entre $P > 0,05$ e $P < 0,10$ indicou que a significância foi aproximadamente significativa. As diferenças que se aproximaram da significância foram incluídas em uma base provisória ou preliminar para consideração potencial em estudos futuros. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média, ao menos que seja indicado.

3.5 RESULTADOS

Uma égua no grupo éguas não gestantes foi omitida das análises devido às altas concentrações de PGFM periféricas ($P < 0,05$) nos dias 4–11. O número de éguas restantes nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes foi de 8 e 9, respectivamente. Um total de 12 éguas foram inseminadas para obter as 9 gestações.

O início da luteólise no grupo éguas não gestantes foi no Dia $13,1 \pm 0,4$ e mostrado para cada égua (Figura 3). O início da luteólise no dia 13 ocorreu em 5 das 8 éguas. O último dia em que as concentrações médias de P4 diminuíram para $< 1,0$ ng/mL (fim da luteólise) foi o dia $15,4 \pm 0,3$ e o último dia em indivíduos foi o dia 17. As concentrações de P4 foram comparadas entre os grupos nos dias 0–18; o principal efeito do dia e a interação do grupo por dia foram significativos (Figura 3, painel superior). A concentração de P4 foi maior no dia 7 em cada grupo e diminuiu ($P < 0,05$) em cada grupo no dia 13. Não houve diferença significativa entre os grupos entre os dias 7–13. A primeira diminuição de P4 entre os dias adjacentes no grupo éguas não gestantes que foi maior ($P < 0,05$) do que os valores diárias anteriores ocorreram

entre os dias 13 e 14. O primeiro dia de concentrações menores ($P < 0,05$) de P4 nas éguas não gestantes do que nas éguas gestantes foi no dia 14. Não houve um efeito significativo do dia para P4 entre os dias 13–24 nas éguas gestantes.

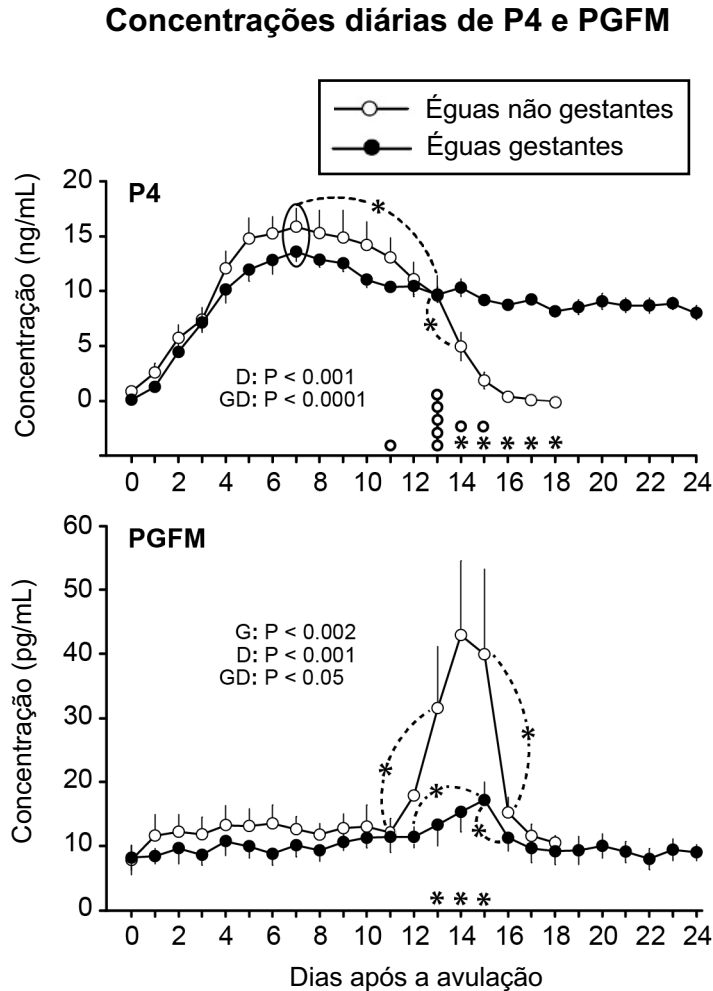


Figura 3. Média \pm SEM para concentrações de P4 (painel superior) e PGFM (painel inferior) nos dias 0 a 18 após a ovulação no grupo éguas não gestantes e no grupo éguas gestantes com continuação até o dia 24 no grupo éguas gestantes. As probabilidades que foram significativas para o efeito principal do grupo (G) e hora (H) e a interação do grupo por hora (GH) são apresentadas para cada painel. Um círculo acima do eixo do dia do painel superior indica o dia de início da luteólise para cada égua individual no grupo éguas não gestante. Um asterisco (*) acima do eixo do dia indica uma diferença ($P < 0,05$) entre os dois grupos. Um asterisco (*) em um arco entre duas médias indica uma diferença ($P < 0,05$) entre as duas médias. P4, progesterona; PGFM, metabólito de PGF2 α .

As concentrações de uma única amostra diária de PGFM nos dias 0 a 18 tiveram efeitos principais significativos de grupo e dia e uma interação de grupo por dia (Figura 3, painel inferior). A interação foi principalmente devido a uma maior concentração de PGFM nas éguas não gestantes do que nas éguas gestantes nos dias 13–15. No grupo éguas não gestantes, a concentração de PGFM aumentou ($P < 0,05$) entre os dias 11–13 e diminuiu ($P < 0,05$) entre os dias 15 e 16. No grupo de éguas gestantes, o PGFM aumentou ($P < 0,05$) entre os dias 12–15 e diminuiu ($P < 0,05$) entre os dias 15–16. A concentração média máxima de PGFM nos dias 12–15 foi 2,6 vezes maior nas éguas não gestantes do que nas éguas gestantes.

A normalização dos dados para o dia da concentração máxima de PGFM (dia 0M) para os dias 12–16 no grupo de éguas gestantes indicou apenas uma diferença significativa entre os dias adjacentes nos dias –3 a +3 com base no teste t-teste pareado. A diferença foi para uma diminuição ($P < 0,006$) na concentração de P4 entre o dia 0M ($10,8 \pm 1,0$ ng/mL) e o dia 1 ($9,0 \pm 0,9$ ng/mL). A concentração de P4 entre os dias 1 e 2 ($9,4 \pm 0,7$ ng/mL) aumentou, mas não significativamente ($P < 0,2$). A normalização para o dia da concentração máxima de PGFM durante outras séries de dias (dias 4–7, 9–11) não indicou uma redução associada em P4 durante no grupo de éguas não gestantes e no grupo de éguas gestantes. As concentrações de PGFM entre os dias 0–11 não mudaram significativamente em nenhum dos grupos ou entre os grupos e não mudaram nos dias 16–24 no grupo de éguas gestantes.

A normalização dos dados para o início da luteólise (dia 0B) indicou que o primeiro dia de um aumento ($P < 0,04$) na concentração máxima diária de PGFM ocorreu nos dias -1 a 0B ou no dia antes da primeira diminuição diária ($P < 0,05$) de P4 (Figura 4). A diferença na concentração máxima de PGFM entre os dias -1 e 0B ($26,7 \pm 13,9$ pg/mL) foi menor ($P < 0,03$) do que a diferença entre os dias 0B e 1 ($107,7 \pm 38,1$ pg/mL). Quando as concentrações de PGFM foi normalizada para o final da luteólise (dia 0E), um aumento de PGFM máximo foi observado nos dias –4 a –2. A maior concentração média diária de PGFM ocorreu no dia -1 ou no dia anterior ao final da luteólise.

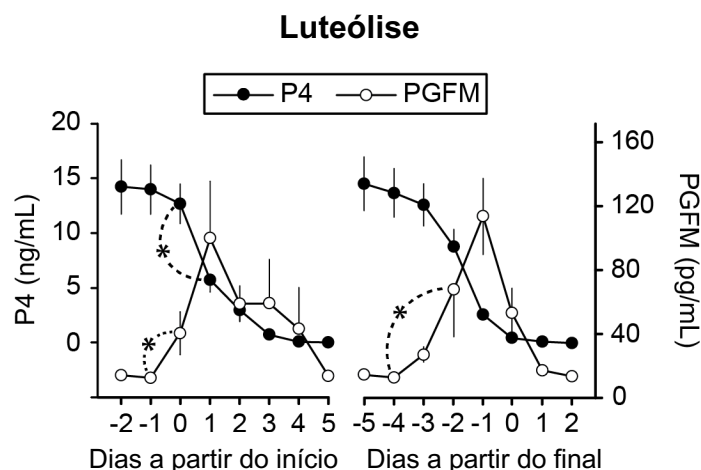


Figura 4. Média \pm SEM para as concentrações máximas de P4 e PGFM nos dias –2 a 5 desde o início da luteólise (painel esquerdo) e nos dias –5 a 2 a partir do final da luteólise (painel direito) no grupo éguas não gestantes. Um asterisco (*) em um arco entre duas médias indica uma diferença ($P < 0,05$) entre as duas médias. P4, progesterona; PGFM, metabólito PGF2 α .

Os valores médios, máximos e mínimos das concentrações de PGFM para as amostras de hora em hora das sessões de 8 horas em cada dia de cada um dos três conjuntos de dias são mostradas (Figura 5). O efeito do grupo foi representado por haver maiores concentrações médias ($14,4 \pm 1,4$ vs $9,5 \pm 0,5$ pg/mL) e máximas ($32,5 \pm 5,0$ vs $14,5 \pm 0,7$ pg/mL) de PGFM no grupo éguas não gestantes do que no grupo éguas gestantes, respectivamente. O efeito do dia foi representado por haver maiores concentrações médias e máximas de PGFM entre os dois grupos nos dias 13–16. A interação do grupo por dia para os valores médios e máximos foi principalmente de maior ($P < 0,05$) concentração de PGFM no grupo éguas não gestantes do que grupo éguas gestantes nos dias 13–15, sem diferenças entre os grupos nos dias restantes. Para a concentração mínima de PGFM durante as sessões de 8 h, não houve efeitos significativos de grupo ou dia, nem interação do grupo por dia. Para o número de pulsos de

PGFM identificados por CV por 8 h, nenhuma diferença significativa foi detectada (no geral, 0,7 pulsos por 8 h).

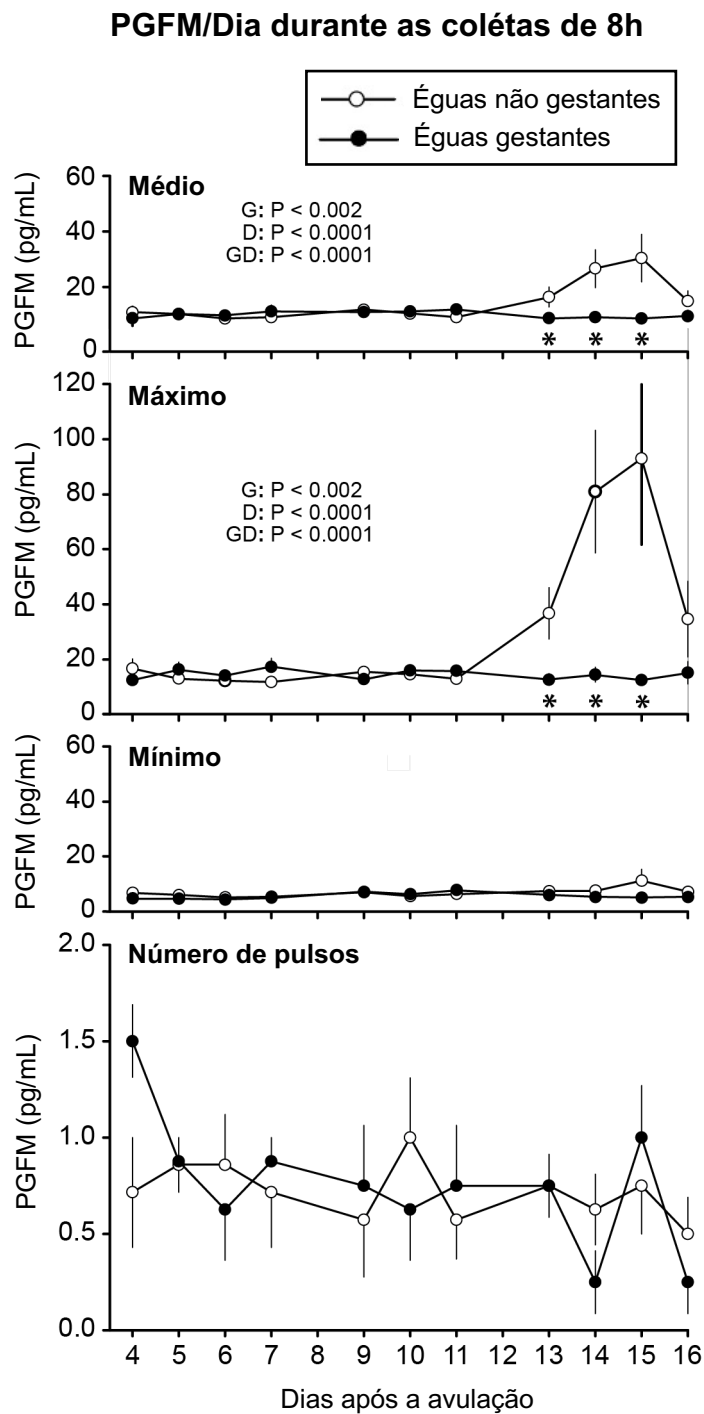


Figura 5. Média \pm SEM para valores médio, máximo e mínimo das concentrações de PGFM e número de pulsos identificados por CV em sessões de 8 h de amostragem por hora para cada dia em éguas não gestantes e éguas gestantes. As probabilidades que foram significativas para o efeito principal do grupo (G) e hora (H) e a interação do grupo por hora (GH) são apresentadas para cada painel. Um asterisco (*) acima do eixo do dia indica uma diferença ($P < 0,05$) entre os dois grupos. CV, coeficiente de variação; PGFM, metabólito $PGF2\alpha$.

As características do pulso mais proeminente de PGFM durante as coletas de hora em hora dentro de cada um dos três conjuntos de dias (dias 4–7, 9–11, 13–16) nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes são mostradas (Tabela 1). As diferenças entre os conjuntos de dias em éguas não gestantes foram significativas ou tenderam a significância para nadir 1, amplitude, pico, nadir 2, intervalo do nadir 1 ao nadir 2 e área sob a curva. Para cada um desses pontos nas éguas não gestantes, o conjunto de dias 13–16 apresentou maior valor ($P < 0,05$) do que para cada um dos conjuntos de dias 4–7 e 9–11. Não houve diferença significativa entre os conjuntos de dias para os dias correspondentes no grupo éguas gestantes.

Tabela 1. Média \pm SEM para os pontos principais de todos os pulsos de PGFM nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes.

Pontos principais	Grupo	Conjunto de dias			Probabilidade
		4–7	9–11	13–16	
Nadir 1 (pg/mL)	Éguas não gestantes	8.7 \pm 1.8 ^b	7.3 \pm 0.7 ^b	14.1 \pm 3.0 ^{aaA}	P < 0.06
	Éguas gestantes	6.9 \pm 0.7	7.2 \pm 0.9	6.7 \pm 0.9 ^B	NS
Amplitude (pg/mL)	Éguas não gestantes	6.4 \pm 1.0 ^b	5.4 \pm 0.8 ^b	43.4 \pm 15.6 ^{aaA}	P < 0.01
	Éguas gestantes	7.3 \pm 0.9	6.2 \pm 0.6	5.4 \pm 1.1 ^B	NS
Pico (pg/mL)	Éguas não gestantes	15.1 \pm 2.5 ^b	12.3 \pm 1.1 ^b	57.5 \pm 16.3 ^{aaA}	P < 0.03
	Éguas gestantes	14.3 \pm 1.2	13.3 \pm 1.8	12.0 \pm 1.4 ^B	NS
Nadir 2 (pg/mL)	Éguas não gestantes	8.7 \pm 1.4 ^b	8.1 \pm 0.9 ^b	20.0 \pm 7.0 ^{aaA}	P < 0.10
	Éguas gestantes	6.2 \pm 0.9	9.0 \pm 1.0	6.1 \pm 0.8 ^B	NS
Nadir 1–nadir 2 (h)	Éguas não gestantes	3.9 \pm 0.2 ^{ab}	3.8 \pm 0.2 ^b	4.5 \pm 0.3 ^{aaA}	P < 0.05
	Éguas gestantes	4.0 \pm 0.2	3.7 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2 ^B	NS
Área sob a curva (pg/h/mL)	Éguas não gestantes	45.7 \pm 8.0 ^b	39.0 \pm 3.9 ^b	118.3 \pm 25.4 ^{aaA}	P < 0.003
	Éguas gestantes	39.5 \pm 3.9	39.2 \pm 4.5	31.0 \pm 4.2 ^B	NS

NS = Não significativa.

^{abc} As médias dos valores de PGFM de cada ponto principal no mesmo grupo (mesma linha) com uma letra minúscula diferente são diferentes entre si ($P < 0,05$).

^{AB} As médias dos valores de PGFM de cada ponto principal entre os grupos éguas não gestantes e éguas gestantes (mesma coluna) com uma letra maiúscula diferente são diferentes entre si ($P < 0,05$).

As características dos valores médios dos pulsos de PGFM durante cada sessão de 8 h para cada um dos dias 4–7, 9–11 e 13–16 normalizados por 2 h antes a 2 h após o pico para todos os pulsos e para o pulso mais proeminente por dia são mostrados (Figura 6). Para todos os pulsos e para os pulsos mais proeminentes, apenas o efeito da hora foi significativo para os dias 4–7 e 9–11 com maior concentração no pico (hora 0). Para a sessão de 8 horas nos dias 13–16, o efeito principal do grupo e hora e interação do grupo por hora foram significativos. O efeito de grupo foi representado por maior concentração média de PGFM em pulsos do grupo éguas não gestantes do que no grupo éguas gestantes. A interação do grupo por hora foi devido a uma concentração progressivamente maior nos dias 13–16 no grupo éguas não gestantes do que no grupo éguas gestantes durante a porção ascendente e descendente do pulso. As concentrações foram maiores nas éguas não gestantes em cada uma das cinco horas para todos os pulsos e para os pulsos mais proeminentes.

Pulsos de PGFM

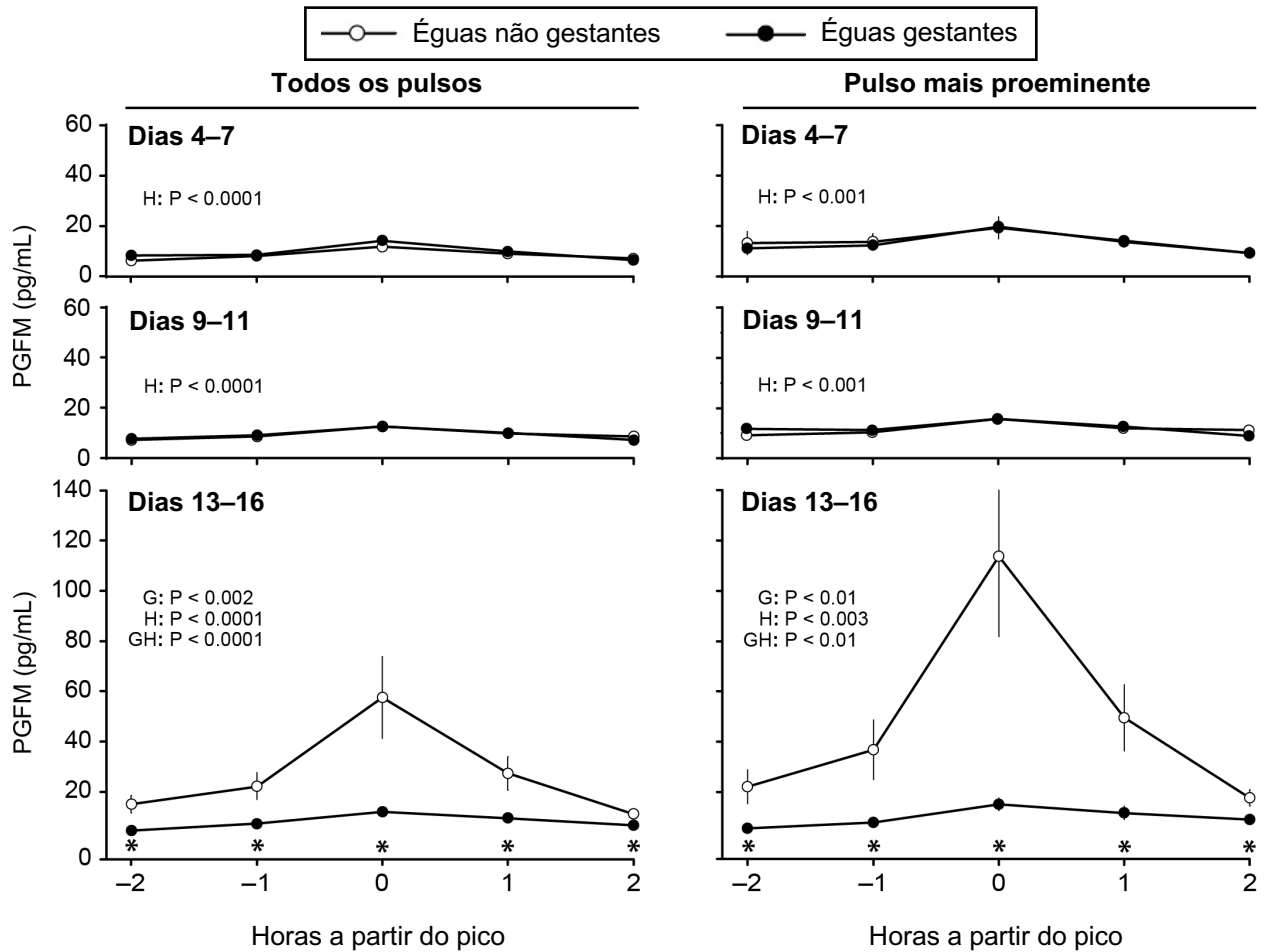


Figura 6. Média \pm SEM para as concentrações de PGFM para todos os pulsos identificados por CV e para o pulso mais pronunciado identificado por CV em sessões de 8 horas em cada um dos conjuntos de dias 4-7, 9-11 e 13-16 nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes. As probabilidades que foram significativas para o efeito principal do grupo (G) e hora (H) e a interação do grupo por hora (GH) são apresentadas para cada painel. Um asterisco (*) acima do eixo do dia indica uma diferença ($P < 0,05$) entre os dois grupos. CV, coeficiente de variação; PGFM, metabólito $\text{PGF}_{2\alpha}$.

3.6 DISCUSSÃO

O aumento progressivo na concentração circulante de P4 durante os dias 0-6 seguido por uma diminuição gradual até o início da luteólise principalmente no dia 13 após a ovulação são característicos de éguas que não estão gestantes. A concentração de P4 durante o início da gestação parece compatível com estudos anteriores que não compararam diretamente a concentração de P4 entre éguas não gestantes e gestantes (BERDFELT & GINTHER, 1996; WILLMANN et al., 2011; FERREIRA et al., 2019). A similaridade (ausência de diferenças significativas) entre o grupo éguas não gestantes e éguas gestantes no aumento progressivo de P4 até ~ dia 6 e a diminuição gradual até o dia 13 indicou que P4 é regulada por mecanismos semelhantes tanto em éguas não gestantes quanto em éguas gestantes, exceto durante a luteólise em éguas não gestantes. A ausência de uma mudança nas concentrações de P4 entre os dias 13 e 24 no grupo éguas gestantes não suportou a aparente continuação da diminuição de P4 por

cerca de mais uma semana após o dia 13 (BERDFELT & GINTHER, 1996; FERREIRA et al., 2019; WILLMANN et al., 2011). A diminuição de 3 dias em P4 (luteólise) no grupo éguas não gestantes foi uma consequência de valores baseados na média, independentemente da ocorrência de luteólise em dias diferentes em cada égua individualmente. Com base em análise de cada indivíduo e em coletas de amostras de sangue de hora em hora, a duração da luteólise em éguas e novilhas requer apenas ~ 24 horas (GINTHER & BEG, 2011).

No presente estudo, as mudanças nas concentrações de P4 no grupo éguas não gestantes no dia 0 até o final da luteólise refletem as relações recíprocas entre P4 e as concentrações de LH durante esse período relatadas na literatura (GINTHER et al., 2006; GINTHER et al., 2007c; GINTHER et al., 2011a; GINTHER et al., 2016b). A concentração máxima de LH durante o pico ovulatório ocorre no dia 1 e, em seguida, diminui durante um aumento em P4 até ~ dia 6. Durante a redução gradual de P4 após o dia 6, o LH também diminui gradualmente e não começa a aumentar até o dia anterior ao fim da luteólise (GINTHER et al., 2006). Apesar dessas associações temporais estreitas entre P4 e LH, não está claro como as associações funcionais estão relacionadas. Um efeito negativo do aumento de P4 no LH foi demonstrado (GASTAL et al., 1999; BERGFELT et al., 2001) e presumivelmente está associado ao declínio no pico de LH até ~ dia 6. O declínio gradual subsequente em ambos P4 e LH pode representar uma perda gradual de um efeito positivo de LH na concentração de P4. Um efeito positivo do hCG (para representar o LH) em P4 foi demonstrado *in vivo* em éguas (KELLY et al., 1988). Os resultados de estudos *in vitro* com células luteais (KELLY et al., 1988) e receptores de LH em células luteais (STEWART & ALLEN, 1979) são consistentes com um efeito positivo do LH na P4.

A concentração de PGFM em amostras diárias depende se uma amostra é coletada durante o intervalo entre os pulsos ou em uma determinada parte de um pulso. Como consequência, a concentração diária de PGFM pode ser bastante variável. No entanto, a probabilidade de encontrar diferenças significativas nas amostras diárias é reforçada por uma maior concentração nos nadirs do pulso, bem como no pico durante a luteólise do que antes da luteólise (GINTHER et al., 2008b; GINTHER et al., 2011a). Semelhante aos resultados do presente estudo, em amostras coletadas diariamente em estudos anteriores apresentaram um aumento nas concentrações de PGFM em associação com luteólise (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2015a; GINTHER et al., 2016a; GINTHER et al., 2016b). A amostragem diária também é eficaz para o estudo inicial da concentração de PGFM, bem como para P4 durante a luteólise em marrãs (GUTHRIE & REXROAD, 1981) e vacas (PARKINSON & LAMMING, 1990).

A hipótese 1 não foi suportada de que as concentrações diárias de PGFM aumentam na interseção entre o final do aumento de P4 e a diminuição gradual de P4 (~ dia 6) em éguas não gestantes. A hipótese foi testada porque a análise post hoc para os dias 4–7 em éguas não gestantes em um estudo anterior (GINTHER et al., 2016b) indicou que há um aumento temporário nas concentrações de PGFM no dia da interseção do aumento para a diminuição gradual de P4. Os autores, especularam que o aumento de PGFM neste momento poderia ser responsável pela mudança nas concentrações de P4. No entanto, em nosso estudo não foi identificado aumento nas concentrações diárias de PGFM ou pulsos de PGFM durante os dias 4–7 nos grupos éguas não gestantes ou gestantes, ou seja, um efeito do PGFM na redução da concentração de P4 no início da redução gradual de P4 não foi confirmado. Uma relação entre um aumento nas concentrações de PGFM e uma diminuição de P4 não foi detectada até o início da luteólise nas éguas não gestantes.

O aumento de PGFM entre os dias 11 e 13 e uma primeira diminuição em P4 entre os dias 13 e 14 nas amostras diárias demonstraram um aumento no PGFM no grupo éguas não gestantes antes do dia do início médio da luteólise. A relação entre um aumento de PGFM e uma diminuição de P4 também foi demonstrada pelo dia da máxima concentração de PGFM durante as sessões de 8 horas de coleta das amostras. A maior concentração média de PGFM

um dia antes do final da luteólise é consistente com a ocorrência do pulso mais proeminente no dia 14 ou 15 em 75% das éguas após o início da luteólise. Em um estudo anterior, o primeiro pulso de PGFM após o final da luteólise foi semelhante em proeminência a um pulso durante a luteólise, exceto que cerca de 17% dos pulsos durante a pós-luteólise foram maiores (outliers) do que um pulso durante a luteólise (GINTHER et al., 2008b).

A associação entre um aumento de PGFM e o início da luteólise com base em amostras diárias no grupo éguas não gestantes são consistentes com estudos anteriores usando amostras coletadas de hora em hora para caracterizar a hora de transição para luteólise em éguas (GINTHER & BEG, 2011; GINTHER et al., 2011a; GINTHER & BEG, 2012a; GINTHER & BEG, 2012b). Pulsos relativamente pequenos de PGFM ocorrem esporadicamente em éguas durante a pré-luteólise (antes da transição), e um pulso pequeno ocorre na transição para a luteólise (GINTHER et al., 2012; GINTHER & BEG, 2012b). O menor aumento de PGFM nos dias -1 a 0B (dia 0B = início da luteólise) do que nos dias 0B a 1 no presente estudo são consistentes com o pulso pequeno de PGFM relatado no início da luteólise. A ocitocina aumenta e diminui concomitantemente com o pulso pequeno de PGFM na transição para a luteólise, mas não com pulsos antes da luteólise e pode ser responsável pelo início da luteólise durante um pulso pequeno de PGFM (GINTHER & BEG, 2012b). Nesse sentido, as concentrações circulantes de ocitocina tendem a aumentar durante a porção ascendente de um pulso de PGFM durante a luteólise (GINTHER & BEG, 2009), e os pulsos de PGFM são induzidos pelo tratamento com ocitocina (SANTOS et al., 2015b). A ocitocina pode participar de um ciclo de feedback positivo com liberação de PGF2 α em éguas como em ruminantes (UTT et al., 2007).

Em bovinos, o último pulso de PGFM durante a pré-luteólise ocorre horas antes da transição para luteólise (por exemplo, 4 h), e o próximo pulso ocorre bem após a transição (por exemplo, 9 h); ao contrário das éguas, o pulso de PGFM não ocorre na hora da transição para a luteólise (GINTHER & BEG, 2012b). Em cada uma das duas espécies, o estradiol aumenta durante um pulso de PGFM com um platô entre os pulsos; O LH aumenta durante a porção descendente do pulso de PGFM em bovinos, mas não em éguas (GINTHER et al., 2011b). As duas espécies também diferem nas relações P4/PGFM durante a luteólise. Em éguas, P4 diminui gradualmente linearmente antes, durante e depois de um pulso de PGFM (GINTHER et al., 2008b; GINTHER et al., 2011a; GINTHER et al., 2011b). Em novilhas, P4 diminui durante a porção ascendente do pulso de PGFM e aumenta durante a porção descendente (GINTHER et al., 2010a; GINTHER et al., 2010b; GINTHER et al., 2010c). Cada espécie tem um mecanismo luteolítico eficaz, apesar das profundas diferenças entre as espécies na relação P4/PGFM no início da luteólise e nas relações hormonais envolvendo pulso de PGFM.

Este trabalho é aparentemente o primeiro estudo envolvendo a comparação das contrações de P4 e PGFM durante o período interovulatório em éguas não gestantes comparando com os mesmos dias em éguas gestantes. Estudos semelhantes foram feitos em bovinos [novilhas (PINAFFI et al., 2018); vacas (MEZERA et al., 2019)]. Uma dificuldade em tais estudos é que o tempo em que a luteólise teria ocorrido em éguas gestantes é desconhecido, e uma comparação direta entre o tempo de luteólise nas éguas não gestantes e o tempo de prevenção da luteólise em éguas gestantes não é viável.

Isso foi considerado no presente estudo comparando-se as características de PGFM entre os grupos éguas não gestantes e éguas gestantes em intervalos de dias designados, independentemente de quando a luteólise ocorreu ou teria ocorrido. Os resultados da concentração média e máxima de PGFM calculados para as amostras de nove horas durante as sessões de 8 horas foram semelhantes aos resultados para uma única amostra em cada dia. Para ambas as abordagens, as concentrações de PGFM durante os dias 13–15 foram maiores no grupo éguas não gestantes do que no grupo éguas gestantes, sem diferenças entre os grupos em qualquer outro dia.

Durante o período interovulatório em éguas não gestantes o $\text{PGF2}\alpha$ é liberado do útero (GINTHER, 2009; MCDOWELL & SHARP, 2011; STOUT, 2011) e estimula a luteólise nos dias 13–15. A presença do embrião no útero suprime a luteólise e permite a manutenção da gestação (EARLY et al., 2010). A semelhança entre os grupos éguas não gestantes e éguas gestantes na concentração mínima de PGFM durante cada uma das sessões de 8 horas nos dias 4–7, 9–11 e 13–16 também ocorre em novilhas nos dias 16–18 (dias de luteólise) (PINAFFI et al., 2018). Ou seja, em ambas as espécies, a $\text{PGF2}\alpha$ liberada está em concentração máxima durante a luteólise, mas na concentração mínima nos outros dias durante o período interovulatório em éguas não gestantes e início da gestação.

O aumento médio de PGFM no grupo éguas gestantes nos dias 12–15 foi muito menor do que no grupo éguas não gestantes, mas questiona se houve um efeito do PGFM em P4 durante a gestação. As diminuições em P4 entre o dia de máxima concentração de PGFM nos dias 12–15 e o dia seguinte tendem a indicar que PGFM teve um leve efeito negativo transitório em P4 durante a gestação. Esta observação é considerada provisória e requer confirmação. Um aumento de PGFM durante a gestação também ocorre em novilhas nos dias correspondentes aos dias de luteólise (dias 16–18) (PINAFFI, et al., 2018). Em ambas as espécies, as concentrações de PGFM durante a gestação são consideravelmente menores do que durante a luteólise e o valor máximo de PGFM é atingido cerca de um dia antes do final da luteólise. O mecanismo envolvendo pequeno e atraso no aumento da PGFM durante a gestação em um momento correspondente à luteólise não é conhecido. Em novilhas prenhes, as concentrações de P4 com base na inspeção de um gráfico publicado (PINAFFI, et al., 2018) também parecem começar a diminuir no dia (dia 19) de máxima concentração de PGFM. Estudos adicionais em cada espécie com amostragem mais frequente serão necessários para apoiar essas observações provisórias.

O número de pulsos de PGFM em éguas durante a luteólise (0,7 pulsos/8 h) é consistente com relato anterior em éguas (SANTOS et al., 2013). Nenhuma diferença significativa no número de pulsos de PGFM entre éguas não gestantes e éguas gestantes está de acordo com semelhante estudo em ovelhas (ZARCO et al., 1988) e novilhas (PINAFFI, et al., 2018). Baseado na mesma metodologia para identificar pulsos de PGFM por CV usando uma sessão de 8 h, o número de pulsos de PGFM foi aparentemente menor em éguas (0,7 pulsos/sessão) do que relatado para novilhas (1,5 pulsos/sessão). A meia-vida da PGF em éguas é três vezes maior do que em bovinos (SHRESTHA et al., 2012) e pode ser responsável por envolver menos pulsos em éguas do que em bovinos. O método usado para identificar pulsos de PGFM no presente estudo pareceu eficiente em vários estudos anteriores em éguas (GINTHER et al., 2008b; GINTHER et al., 2011a) e novilhas (GINTHER et al., 2007b; PINAFFI et al., 2018).

A amplitude dos pulsos de PGFM no dia 4 no grupo éguas gestantes foi baixa ($7,4 \pm 0,9$ pg/mL) em comparação com a amplitude do pulso mais proeminente durante a luteólise ($91,1 \pm 32,8$ pg/mL). O número maior de pulsos de PGFM no dia 4 no grupo éguas gestantes do que no grupo éguas não gestantes foi de uma análise post hoc e, portanto, provisória. Durante o transporte do embrião equino pelo oviduto nos dias 4 e 5, o embrião secreta prostaglandina E2 (WEBER et al., 1991) e $\text{PGF2}\alpha$ (WEBER et al., 1993) e, o músculo do oviduto secreta $\text{PGF2}\alpha$ (TROEDSSON et al., 1995). O aumento no número de pulsos de PGFM no dia 4 no grupo éguas gestantes pode estar relacionado ao aumento de $\text{PGF2}\alpha$ no oviduto, assumindo que a $\text{PGF2}\alpha$ seria detectável no sangue sistêmico. Isso parece improvável, mas estudos adicionais seriam necessários. Também é improvável que o maior número de pulsos de PGFM representasse inflamação ou resíduo da inseminação. Foi relatado que 48 h após a inseminação, os restos de espermatozoides haviam desaparecido, corinebactérias não foram diagnosticadas em cultivo, o número de neutrófilos não estava mais aumentado e os sinais clínicos de inflamação não foram mais detectados (KATILA, 1995).

Em éguas no presente estudo, assim como, em novilhas de um estudo relatado (PINAFFI et al., 2018), as concentrações de PGFM durante um pulso identificado por CV foram maiores durante a luteólise do que durante os dias correspondentes em animais gestantes (éguas, dias 13–16; novilhas, dias 16–18). Em ambas as espécies, as diferenças entre os animais não gestantes e gestantes ocorreram para todos os pontos principais dos pulsos de PGFM (nadirs, amplitude, pico).

A hipótese 2 foi suportada em que éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias de pulsos de alta amplitude na luteólise em éguas não gestantes. A diferença entre éguas não gestantes e éguas gestantes durante esses dias ocorreu para os nadirs e pico. A este respeito, os baixos valores de nadirs, amplitude e pico em éguas gestantes ocorreram não apenas durante os dias correspondentes à luteólise (dias 13–16), mas também para as outras séries de dias (dias 4–7 e 9–11). Isso foi mostrado por não haver nenhuma diferença entre as séries de três dias nas éguas gestantes tanto para os dados tabulados para todos os pulsos quanto para a exibição gráfica de 2 dias antes do pico a 2 dias após o pico. O aumento de PGFM em amostras diárias nos dias 13–16, apesar da consistência em pulsos de PGFM de baixa amplitude ao longo do início da gestação, parece indicar que o aumento diário não foi uma consequência do aumento da pulsatilidade de PGFM. Futuros estudos envolvendo diferenças no aumento de PGFM em éguas não gestantes e gestantes nos dias 13–16 podem fornecer informações sobre as vias metabólicas na produção de PGF2 α , incluindo auto-amplificação de PGF2 α (KOZAI et al., 2016).

3.7 CONCLUSÕES

Um efeito do PGFM na redução da concentração de P4 no início da redução gradual de P4, não foi confirmado. Aparentemente o único efeito da PGF2 α na redução das concentrações de P4 ocorre durante a luteólise em éguas não gestantes. Éguas gestantes têm pulsos de PGFM de baixa amplitude durante os dias de pulsos de alta amplitude na luteólise em éguas não gestantes. Estudos futuros com coletas de amostras de sangue mais frequentes e por um período maior são necessários para esclarecer possíveis efeitos do aumento da PGFM em éguas gestantes.

4 CAPÍTULO II. ALTERAÇÕES LOCAIS NA EXPRESSÃO GÊNICA ENDOMETRIAL MEDIADAS PELO EMBRIÃO DURANTE O PERÍODO DE MOBILIDADE EMBRIONARIA EM ÉGUAS

T. Castro^{a,b,c}, J.C. Jacob^a, R.R. Domingues^{b,c}, O.J. Ginther^{b,c,*}

^aDepartamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

^bEutheria Foundation, Cross Plains, Wisconsin 53528, USA

^cDepartment of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706, USA

*Correspondente: Tel.: +1 608 798 3777;
E-mail: oj.ginther@wisc.edu (O.J. Ginther)

4.1 RESUMO

As prostaglandinas E2 (PGE2) e a F2 α (PGF2 α) estão envolvidas na mobilidade do embrião equino ao longo do útero nos dias 11–15 (ovulação = dia 0). As expressões gênicas no endométrio foram comparadas entre o corno uterino com embrião e o corno sem o embrião, nas éguas gestantes (n = 13) e o corno uterino de éguas não gestantes (n = 10) no dia de máxima mobilidade embrionária (dia 12). Uma escova citológica foi usada para coletar amostras endometriais no segmento médio de cada corno uterino. Em éguas não gestantes, não houve diferença na expressão gênica dos genes avaliados entre o corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL ou nos cornos uterinos esquerdos vs direito. Para expressão gênica de receptores endometriais de estrogênio, ESR1 foi menos (P < 0,03) e ESR2 foi mais (P < 0,04) expressado nas éguas gestantes do que nas éguas não gestantes. A abundância de mRNA para PGE2 sintase (PTGES) foi maior (P < 0,05) no corno com (1,40 \pm 0,10) do que sem (0,89 \pm 0,10) o embrião e foi maior (P < 0,05) no corno com o embrião do que nos cornos de éguas não gestantes (1,06 \pm 0,10). A hipótese foi de que o embrião regula positivamente a síntese de PGE2 e PGF2 α localmente no endométrio adjacente ao embrião no grupo éguas gestantes, mas não nos cornos uterinos de éguas não gestantes, foi parcialmente suportada; somente PGE2 sintase (PTGES) foi regulada positivamente no endométrio adjacente ao embrião móvel.

Palavras-chave: escova citológica, endométrio, gestação, gene, prostaglandinas.

4.2 ABSTRACT

Prostaglandin E2 (PGE2) and prostaglandin F2 α (PGF2 α) are involved in equine embryo mobility throughout the uterus on days 11–15 (ovulation = day 0). On a day (day 12) of maximal embryo mobility in pregnant mares (n = 13) and before luteolysis in nonbred mares (n = 10), gene expressions in the endometrium were compared between the uterine horn that did and did not contain the mobile embryo and between pregnant and nonbred mares. A cytobrush was used to collect an endometrial sample from the middle of each uterine horn. In nonbred mares, there was no difference for any of the considered gene expressions between the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL or for side (left vs right). For endometrial estrogen receptors, ESR1 was lower (P < 0.03) and ESR2 was greater (P < 0.04) for pregnant than nonbred mares. The mRNA abundance for PGE2 synthase (PTGES) was greater (P < 0.05) in the horn with (1.40 \pm 0.10) than without (0.89 \pm 0.10) the embryo and was greater (P < 0.05) in the horn with the embryo than in the combined horns of nonbred mares (1.06 \pm 0.10). The hypothesis that the embryo locally upregulates PGE2 and PGF2 α synthesis in the endometrium adjacent to the embryo in the pregnant group but not in the uterine horns of the nonbred group, was partially supported; only PGE2 synthase (PTGES) was locally upregulated in the endometrium adjacent to the mobile embryo.

Keywords: cytobrush, endometrium, pregnancy, gene, prostaglandins.

4.3 INTRODUÇÃO

A concentração de progesterona (P4) em éguas aumenta até o dia 7 (dia 0 = ovulação) e diminui gradualmente em éguas não gestantes e gestantes até o início da luteólise, no dia 13, em éguas não gestantes (CASTRO et al., 2021). Por volta do dia 13, em éguas não gestantes, a prostaglandina F2 α (PGF2 α) é liberada pelo endométrio e induz diminuição nas concentrações de P4 ocorrendo a luteólise (SANTOS et al., 2015b). A PGF2 α é transportada do útero para o ovário ipsilateral ao corpo lúteo (CL) por uma rota sistêmica em éguas (DOUGLAS et al., 1975), diferente de uma rota uterolútea unilateral em várias outras espécies incluindo bovinos. A síntese e secreção de PGF2 α e luteólise são bloqueadas em éguas gestantes, o que contribui para manutenção das concentrações de P4, que é essencial para manutenção da gestação (STOUT, 2016). A interação entre diferentes hormônios esteróides e prostaglandinas e seus receptores endometriais envolvem vias complexas e desempenha um papel importante na regulação do ciclo estral e na manutenção da gestação inicial. Está bem estabelecido que a presença de um embrião tem influência nas atividades endometriais (KLEIN et al., 2010), e as atividades endometriais influenciam a regulação e função ovariana (GINTHER et al., 1992).

Os hormônios P4 e estradiol são os principais reguladores das características morfológicas e das alterações funcionais no endométrio equino (AURICH, 2011). Em éguas, a dinâmica do receptor de estrogênio (ER) e do receptor de progesterona (PGR) no útero foi descrita (MCDOWELL, et al., 1999; HART et al., 2005). Os receptores de estrogênio endometrial são ESR α (ESR1) e ESR β (ESR2) (ENMARK et al., 1997). O ESR1 desempenha um papel importante nos efeitos uterotróficos do estrogênio (LUBAHN et al., 1993), enquanto a função do ESR2 no endométrio não é bem conhecida (REBORDÃO et al., 2017). Além disso, o ESR2 tem uma homologia de sequência considerável com o ESR1 (HIROI et al., 1999). Para a síntese de prostaglandinas, a ocitocina se liga aos seus receptores endometriais (OXTR) que estimulam a ativação da fosfolipase A2 (PLA2), que mobiliza o ácido araquidônico (MCCRACKEN et al., 1999). O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina H2 (PGH2) pela prostaglandina-endoperóxido sintase 1 (PTGS1) e prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2). O PTGS1 e PTGS2 também são conhecidos como COX1 e COX2, respectivamente. O PGH2 é convertido em prostaglandina E2 (PGE2) ou PGF2 α pela PGE sintase (PTGES) e PGF sintase (PTGFS), respectivamente (NEEDLEMAN et al., 1986). O transporte de PGF através da membrana plasmática nas células endometriais é facilitado por um transportador de PGF (SCLCO2A1) (SCHUSTER, 2002). A PGE2 e a PGF2 α são convertidas em seus metabólitos pela enzima 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (HPGD) (NEEDLEMAN et al., 1986).

O embrião equino passa do oviduto ao corno uterino por volta do dia 6 (JACOB et al., 2012). O embrião equino é detectado pela primeira vez por imagem ultrassonográfica nos dias 9 ou 10 (GRIFFIN et al., 1993). O embrião equino migra por todo lúmen uterino (GINTHER, 1983) e atinge a mobilidade máxima nos dias 11–12 (GRIFFIN & GINTHER, 1990) em associação com a contratilidade uterina máxima (CROSS & GINTHER, 1990). A mobilidade do embrião cessa quando o embrião se fixa em um dos cornos uterinos nos dias 15–16 (GINTHER, 1995b). O tratamento de PGE2 por via intrauterina ou via intravenosa no dia 12 (GASTAL et al., 1998), assim como, tratamento com PGF2 α *in vitro* (RIGBY et al., 2001) no dia 12 estimulam as contrações miometriais. Além disso, o tratamento com PGE2 e PGF2 α intramuscular durante o diestro aumenta a atividade elétrica do miométrio (TROEDSSON et al., 1995). Por outro lado, a mobilidade do embrião associada com diminuição das contrações uterinas é diminuída com clenbuterol (LEITH & GINTHER, 1985) e anti-inflamatórios não esteróides (STOUT & ALLEN, 2002). A PGE2 produzida *in vitro* pelo embrião equino liga-se ao tecido endometrial de éguas não gestantes nos dias 11–15 (VANDERWALL et al., 1993).

Tanto a PGE2 quanto a PGF2 α são produzidas pelo embrião e pelo endométrio (WATSON & SERTICH, 1989; PIOTROWSKA-TOMALA et al., 2020). No entanto, o fluido uterino coletado nos dias 14 e 16 em éguas gestantes contém PGE2, mas não PGF2 α (STOUT & ALLEN, 2002), tendo a PGE2 como o principal estimulador da mobilidade do embrião.

Foi demonstrado que ligadura cirúrgica na base dos dois cornos uterinos para evitar a migração do embrião por todo útero resulta em luteólise (MCDOWELL et al., 1988) e aumenta o tônus uterino e a contratilidade no corno uterino com o embrião, mas não no corno uterino que não está exposto ao embrião (GRIFFIN et al., 1993). As contrações do corpo uterino diminuem 55 minutos após o embrião deixar o corpo uterino (GRIFFIN & GINTHER, 1993). A vascularização endometrial aumenta em éguas gestantes já nos dias 7–8 (NIETO-OLMEDO et al., 2020). A vascularização endometrial é maior no corno uterino que contém o embrião do que no corno oposto ao embrião nos dias 12–15 e a vascularização endometrial aumenta em 7 minutos após o embrião entrar no corno uterino (SILVA et al., 2005). Esses estudos demonstraram um efeito intrauterino local do embrião móvel na prevenção da luteólise e na alteração das características uterinas, incluindo a estimulação local das contrações uterinas e do fluxo sanguíneo endometrial. No entanto, um efeito local do embrião equino na expressão gênica endometrial *in vivo* aparentemente não foi relatado.

O presente estudo foi realizado durante a mobilidade máxima do embrião (dia 12) para comparar simultaneamente as mudanças moleculares no endométrio entre o corno uterino que contém e não contém o embrião móvel. A hipótese foi que o embrião regula positivamente a síntese de PGE2 e PGF2 α localmente no endométrio adjacente ao embrião no grupo éguas gestantes, mas não nos cornos uterinos de éguas não gestantes.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Local

O experimento foi conduzido de janeiro a março de 2020 no Setor de Equinos (Matrizes), na Área de Reprodução Animal (ARA) e no Setor de Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Animal (SFRIA) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica – RJ, latitude: 22°44'38", longitude: 43°42'27".

As análises hormonais foram realizadas no laboratório do Departamento de Ciências Patobiológicas da University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, no norte dos Estados Unidos da América, latitude: 43°4'22.98", longitude 89°24'4.42".

4.4.2 Animais e inseminação

Foram utilizadas 23 éguas não lactantes da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 6 e 15 anos e pesando de 388 a 462 kg. As éguas foram mantidas sob luz natural em piquetes coletivos com capim grama estrela e acesso a sal mineral e água.

Todas as éguas permaneceram saudáveis e com bom estado de condição corporal, segundo a escala de Henneke et al. (1983). Anormalidades do trato reprodutivo incluindo fluido durante o diestro (indicador de endometrite) (GINTHER & PIERSON, 1984) não foram detectados por avaliação ultrassonográfica transretal. Além disso, animais que apresentaram dupla ovulação ou que ovularam durante o diestro não foram utilizados. Os animais foram utilizados a partir do segundo período interovulatório da estação de monta, ou seja, a partir da segunda ovulação. As éguas foram tratadas de acordo com o Comitê de Ética no Uso de

Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo CEUA número 022-10-2018-CEUA).

Éguas em diestro, indicado pela presença de um CL ativo, foram tratadas com 5 mg de PGF2 α (dinoprost trometamina, Lutalyse, Zoetis, SP, Brasil) e posteriormente avaliadas diariamente até um folículo pré-ovulatório de pelo menos 35 mm e um escore ecotextural endometrial de 3 ou 4 (GINTHER & PIERSON, 1984; GINTHER et al., 1986). Em seguida, todas as éguas foram induzidas a ovular por administração intravenosa de 1000 UI de hCG (Vetecor, Hertape Calier®). A inseminação artificial foi realizada com sêmen fresco (20–30 mL, contendo 500×10^6 células total de espermatozóides progressivamente móveis) diluído na proporção 1:1 de diluente de sêmen (Botusemen®; Botupharma, Brasil) 24 horas após a indução da ovulação. Foi utilizado sêmen de dois garanhões com fertilidade comprovada. A ovulação foi determinada uma vez por dia, e o dia da ovulação foi designado como dia 0. O diagnóstico de gestação foi feito por imagem ultrassonográfica no dia 12.

4.4.3 Delineamento experimental

O experimento foi dividido em dois grupos: éguas não gestantes que não foram inseminadas (n = 10) e éguas gestantes após a inseminação (n = 13). Para coleta de amostras endometriais, o útero foi dividido em três segmentos imaginários de comprimento semelhante para cada corno uterino e corpo do útero conforme descrito (GINTHER, 1984a) e ilustrado na Figura 7. Amostras de células uterinas foram coletadas com auxílio de uma escova citológica para avaliação da expressão relativa de mRNA de genes associados a hormônios esteroides e a produção de prostaglandina.

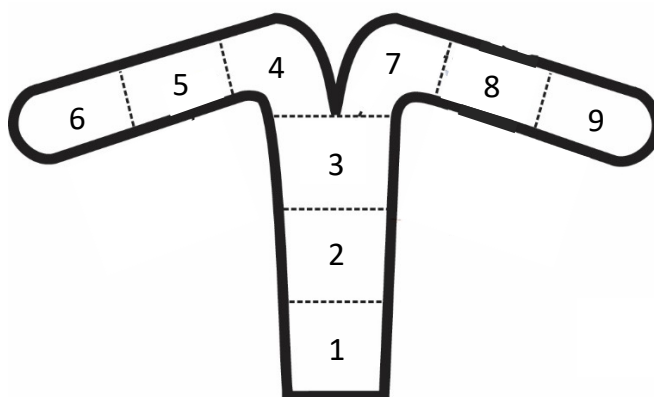


Figura 7. Modelo para avaliação da mobilidade embrionária no útero. (1) segmento caudal do corpo do útero, (2) seguimento médio do corpo do útero, (3) seguimento cranial do corpo do útero, (4) seguimento caudal do corno uterino esquerdo, (5) seguimento médio do corno uterino esquerdo, (6) seguimento cranial do corno uterino esquerdo, (7) seguimento caudal do corno uterino direito, (8) seguimento médio do corno uterino direito, (9) seguimento cranial do corno uterino direito.

A imagem ultrassonográfica transretal foi usada para determinar o dia da ovulação, o lado do CL, a porcentagem do fluxo sanguíneo do CL (com Doppler colorido) e a extensão do edema uterino. Além disso, a imagem ultrassonográfica foi usada para o diagnóstico de gestação, monitoramento da localização intra-uterina do embrião e para orientação da escova citológica durante a coleta das amostras. O equipamento de ultrassom utilizado (Mindray Z5-Vet; Mindray North America, Mahwah, NJ, EUA) foi equipado com modo-B (escala de cinza) e Doppler colorido com transdutor linear transretal de 7,5 MHz. No dia da coleta de amostras endometriais (dia 12), o fluxo sanguíneo do CL e a área do CL foram avaliados para confirmar que a luteólise não havia começado. Além disso, o lado (esquerdo/direito) do corno uterino,

lado do corno uterino com e sem o embrião e o lado do corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL foram registrados para comparação da expressão gênica de cada possível combinação de corno uterino nas análises estatísticas.

4.4.4 Área do CL

Para avaliação da área do CL foram utilizadas imagens ultrassonográficas em modo-B. A área (cm²) de uma seção transversal do CL para cada exame foi determinada da área máxima do CL calculada a partir da média de duas imagens estáticas. Além disso, a área total do CL foi subtraída da área de cavidade do CL quando presente.

4.4.5 Fluxo sanguíneo do CL

Para avaliação do fluxo sanguíneo do CL, foi utilizado um método de avaliação de porcentagem do fluxo sanguíneo (área de fluxo sanguíneo) (GINTHER et al., 2007a). O CL foi escaneado por inteiro com movimentos contínuos e lentos em tempo real por 1 minuto utilizando o modo Power-flow do modo color-Doppler. Foi atribuída uma nota de 0–100% subjetivamente com relação aos pontos de pixels coloridos (fluxo sanguíneo) na periferia do CL (GINTHER et al., 2007a). Todos os exames com Doppler foram realizados na configuração de ganho 62, filtro 100 Hz, 4,1 cm/s de detecção de fluxo.

4.4.6 Coleta de amostras endometriais

No grupo de éguas gestantes no dia 12, imagem ultrassonográfica por via transretal foi realizada a cada 10 minutos até que a vesícula embrionária se movesse do seguimento cranial do corpo do útero para o segmento médio de um dos cornos uterinos. A escova citológica (PROVAR® - São Paulo, Brasil) foi inserida por via intravaginal e suavemente introduzida no corno uterino com o embrião guiado por imagens ultrassonográficas.

Amostras endometriais foram coletadas no seguimento médio do corno uterino aproximadamente 5 mm caudal ao embrião na primeira coleta (Figura 8). Imediatamente após a primeira coleta, uma segunda amostra endometrial foi coletada no segmento médio do corno uterino oposto ao que ainda não continha o embrião. Para coleta das amostras, a escova citológica foi girada por aproximadamente 20 segundos para a recuperação das células endometriais (CARDOSO et al., 2017; DOMINGUES et al., 2020). Após a coleta, o embrião foi localizado para confirmar que ainda estava no mesmo corno uterino. No grupo de éguas não gestantes, a coleta das células endometriais foi feita no seguimento médio dos dois cornos uterinos (esquerdo e direito), e o lado do CL foi registrado. Após a coleta do material celular endometrial, a escova citológica foi colocada imediatamente em um tubo criogênico de 4,5 mL contendo 1,5 mL de solução RNAlater TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras foram armazenadas a –20 °C por até dois meses até envio ao laboratório.

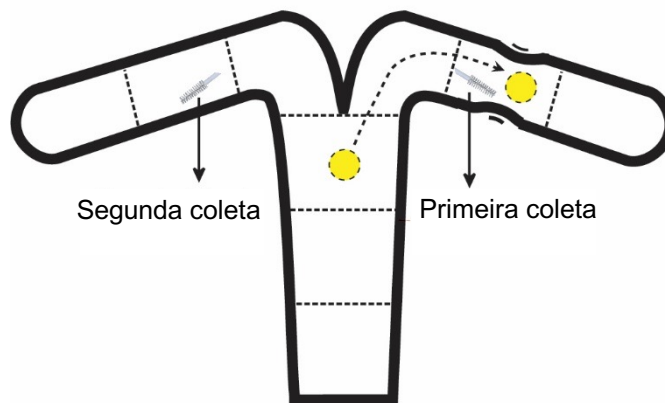


Figura 8. Desenho experimental para coleta de amostra endometrial com escova citológica no grupo de éguas gestantes no dia 12. Imagem ultrassonográfica por via transretal foi realizada a cada 10 minutos até que a vesícula embrionária (círculo amarelo) se movesse do seguimento cranial do corpo do útero para o segmento médio de um dos cornos uterinos. Quando o embrião foi localizado no segmento médio de um dos cornos uterinos, uma escova citológica foi inserida por via intravaginal e suavemente introduzida no corno uterino com o embrião. Amostras endometriais foram coletadas no corno aproximadamente 5 mm caudal ao embrião no primeiro exame. Imediatamente depois disso, uma segunda amostra foi coletada no segmento médio do corno uterino oposto que não continha o embrião. A coleta das amostras endometriais foi guiada por imagens ultrassonográfica.

Ao término da coleta das amostras, estas foram transportadas ao laboratório para as análises. O transporte das amostras foi feito por via aérea durante 24 horas em caixa térmica contendo gelo seco. Todas as amostras permaneceram congeladas durante o transporte. Após a chegada das amostras ao laboratório, elas foram armazenadas ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a realização das análises. As amostras foram transportadas contendo documentos de importação e exportação de material biológico de origem animal emitidos pelo Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Service vinculado ao U.S. Department of Agriculture (USDA) dos Estados Unidos da América. O transporte das amostras também seguiu as normas de segurança estabelecida pela companhia aérea.

4.4.7 Extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação pelo qRT-PCR

O RNA das amostras endometriais foi extraído usando o kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme descrito pelo fabricante. O RNA endometrial das amostras foi quantificado por espectrometria com espectrofotômetro NanoDrop 2000.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme descrito pelo fabricante, usando $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total. O cDNA foi usado diretamente para o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). As reações de qRT-PCR foram realizadas em um sistema CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad Life Science, Hercules, CA, EUA) usando um master mix que continha um volume total de $10,5\text{ }\mu\text{L}$ por tubo, consistindo em $6,25\text{ }\mu\text{L}$ de SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Life Science, Hercules, CA, EUA), $3,25\text{ }\mu\text{L}$ de água livre de nuclease e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de primers direto e reverso ($10\text{ }\mu\text{M}$). Dois μL de cDNA em uma diluição de 1:4 foram adicionados à mistura principal para um volume total de reação de $12,5\text{ }\mu\text{L}$. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. As reações foram iniciadas com pré-incubação a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min, seguida por 42 ciclos de desnaturação ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 segundos) e anelamento e extensão ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos).

Os primers usados estão descritos na Tabela 2. Os primers foram sintetizados por Integrated DNA Technologies Inc. conforme relatado anteriormente (BEHRENDT-ADAM et

al., 1999; ATLI et al., 2010; DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015; REBORDÃO et al., 2017). Eficiências de qRT-PCR para amplificação de genes-alvo foram determinadas em nosso laboratório e variaram de 95% a 106%. Os dados de amplificação obtidos do qRT-PCR como o limite do ciclo (Ct) foram usados para calcular a abundância relativa do mRNA de cada amostra pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). O gene housekeeping utilizado foi o GAPDH (ATLI et al., 2010).

Tabela 2. Sequências dos primers para os genes que foram analisados.

Símbolo do gene	Sequência do Primer	GenBanker	Comprimento do Amplicon
PGR	F: GTCAGTGGACAGATGCTGTA R: CGCCTTGATGAGCTCTCTAA	XM_001498494.4	255
ESR1	F: TCCATGATCAGGTCCACCTTCT R: GGTGTCTGTCATCTTGTTCCA	NM_001081772.1	341
ESR2	F: TCAGCCTGTTTCGACCAAGTG R: CCTTGAAGTCGTTGCCAGGA	XM_001915519.2	194
OXTR	F: CATCGTGCTGGCCTTCATCGTGTG R: GGTAGCCGGAGGAGCAGCAGAGGA	XM_005600468.1	218
PTGS1	F: GAGTACGTGCAGCAGCTGAG R: GTGCCAGTGGTAGAGGTGGT	XM_001163976.1	126
PTGS2	F: TATCCGCCACAGTCAAAGACA R: TGTTGTGTTCCCGCAGCCAAAT	NM_001081775	148
PTGFS	F: AAGCCAGGGCTCAAGTACAA R: AGCACCGTAGGCAACTAGGA	NM_001081895	120
PTGES	F: CACGCTGCTGGTCATCAAGA R: GGTCGTCCCGGTGAAACTG	NM_001081935.1	128
SLCO2A1	F: CGTCTTTCCCCTTCTTTTTCTTTC R: CGCAGCGGGGAGGTTTACG	XM_005601058.1	315
PGFR	F: CGTGTGCTTGTGTTGCTGTT R: ATGGCATTGCACAAGAATGA	NM_001081806	192
PTGER2	F: CCTCCAAGCCCTTAGGTTTC R: TATCCACAAGGGCCAGCTAC	NM_001127352.1	192
HPGD	F: GTTGCACAGCAGCCTGTTTA R: CATCGATGGGTCCAAAATTC	NM_001081786.1	240
GAPDH	F: ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA R: GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG	NM_001163856	341

As sequências dos primers utilizados foram baseadas em trabalhos publicados anteriormente (BEHRENDT-ADAM et al., 1999; ATLI et al., 2010; DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015; REBORDÃO et al., 2017).

4.4.8 Análise estatística

Os dados que não foram distribuídos normalmente na base do teste de Shapiro-Wilk, foram resolvidos por transformação de logaritmos naturais, raiz quadrada ou por ranqueamento. Os dados foram processados pelo sistema de análise estatística (SAS) PROC MIXED com repetições para minimizar as autocorrelações entre medidas sequenciais (versão 9.4; SAS Institute Inc., Cary NC, EUA). A abundância relativa de mRNA foi analisada por ANOVA unilateral ou bidirecional.

Quando um fator foi significativo ou tendência a significância, o teste de Tukey foi utilizado para comparações entre os grupos. O teste t pareado também foi usado em uma base preliminar para comparações de interesse especial. A probabilidade de $P < 0,05$ indicou que a diferença foi significativa, e a probabilidade entre $P > 0,05$ e $P < 0,10$ indicou que a significância foi aproximadamente significativa. As diferenças que se aproximaram da significância foram incluídas em uma base provisória ou preliminar para consideração potencial em estudos futuros. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média, ao menos que seja indicado.

4.5 RESULTADOS

Todas as éguas nos grupos éguas não gestantes e éguas gestantes no dia 12 tinham fluxo sanguíneo do CL $\geq 60\%$ e diâmetro do CL ($\geq 5,8 \text{ cm}^2$) consistente com um CL funcional maduro (GINTHER, 2007). Expressões gênicas endometrial no grupo éguas não gestantes são mostradas (Figura 9). No grupo de éguas não gestantes, não houve diferenças na expressão gênica dos genes avaliados entre os cornos uterinos ipsilateral e contralateral ao CL. O receptor de $\text{PGF}_2\alpha$ (PGFR) teve uma tendência a ser mais expressado no corno uterino contralateral ao CL ($1,15 \pm 0,15$) do que no corno uterino ipsilateral ao CL ($0,60 \pm 0,12$). Não houve interação para nenhuma das expressões gênicas entre o lado do CL (ipsilateral vs contralateral) e o lado do corno uterino (esquerdo vs direito). Foi observada uma tendência ($P < 0,08$) para maior expressão gênica de *SLCO2A1* no corno uterino direito do que no corno uterino esquerdo.

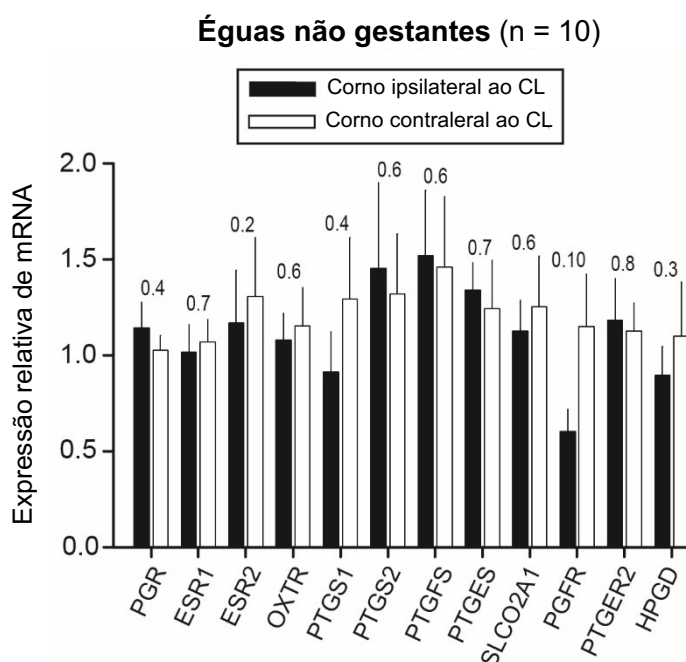


Figura 9. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL no grupo éguas não gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene (sem diferenças significativas). PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; *SLCO2A1*, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina $\text{F}_2\alpha$; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase.

No grupo de éguas gestantes, as expressões gênicas endometriais no corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL são mostradas (Figura 10). A expressão gênica endometrial para o receptor de estrogênio α (ESR1) foi maior no corno uterino contralateral ao CL ($1,27 \pm 0,07$) do que no corno uterino ipsilateral ao CL ($0,98 \pm 0,05$). A expressão gênica endometrial para ESR2 teve uma tendência a ser maior no corno uterino ipsilateral ao CL ($1,56 \pm 0,30$) do que no corno uterino contralateral ao CL ($1,10 \pm 0,14$); não houve diferença na expressão gênica dos genes avaliados entre os cornos uterinos esquerdo e direito. Não houve interação entre a expressão gênica do corno uterino com e sem o embrião e o lado do CL (corno uterino com vs corno uterino sem o embrião vs corno uterino ipsilateral vs corno uterino contralateral ao CL).

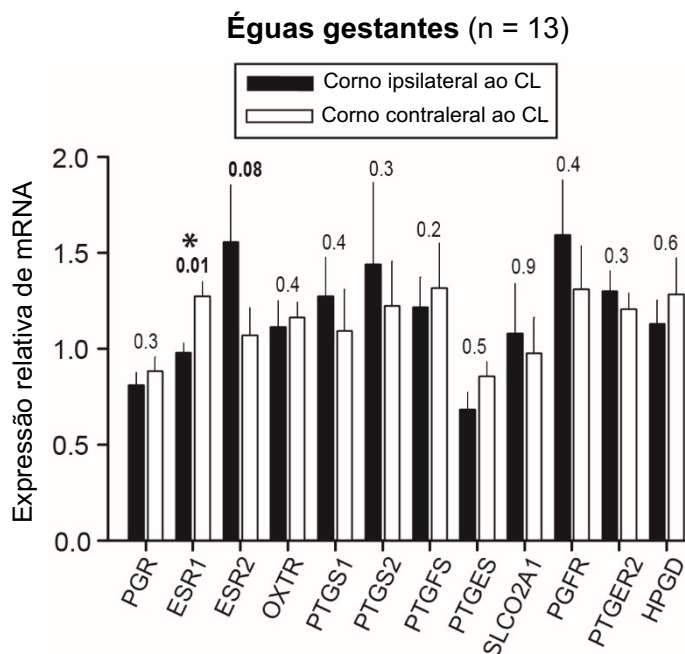


Figura 10. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL no grupo éguas gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene. PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase. Um asterisco (*) indica uma diferença significativa entre os dois cornos uterinos.

As expressões gênicas endometriais no corno uterino com vs sem o embrião são mostradas (Figura 11). A expressão gênica do gene para o receptor de estrogênio β (ESR2) tendeu a ser maior no corno uterino com embrião ($1,28 \pm 0,16$) do que no corno uterino sem o embrião ($0,98 \pm 0,15$) o embrião. A expressão gênica endometrial do gene para a síntese de PGE (PTGES) foi maior para no corno uterino com embrião ($1,43 \pm 0,09$) do que sem o embrião ($0,90 \pm 0,11$) o embrião.

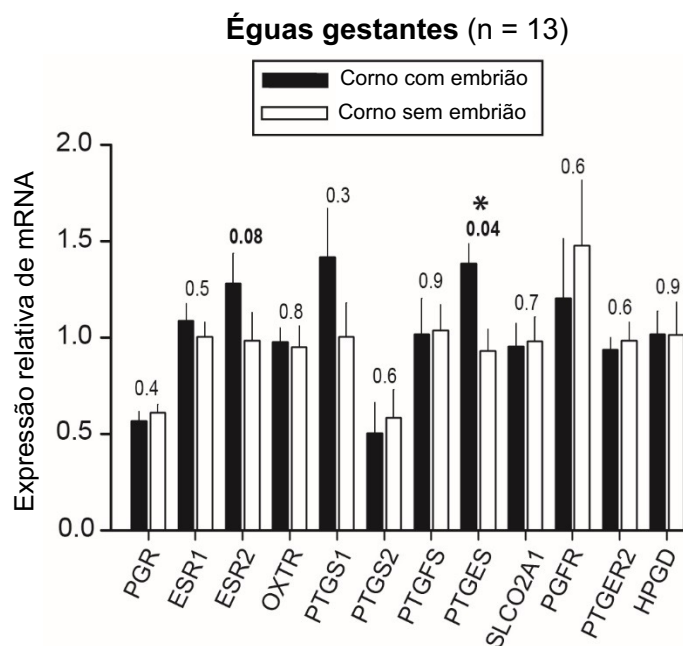


Figura 11. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino com e sem o embrião no grupo éguas gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene. PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase. Um asterisco (*) indica uma diferença significativa entre os dois cornos uterinos.

As expressões gênicas endometriais entre os cornos uterinos direito e esquerdo combinados no grupo de éguas não gestantes e o corno uterino com e sem o embrião no grupo de éguas gestantes são mostradas (Figura 12). A expressão gênica do gene ESR1 foi maior nos cornos uterinos combinados de éguas não gestantes ($1,30 \pm 0,1$) do que no corno uterino com ($0,95 \pm 0,1$) e sem ($0,9 \pm 0,1$) o embrião. A expressão gênica do gene ESR2 foi maior no corno uterino com ($1,51 \pm 0,13$) e sem ($1,40 \pm 0,11$) o embrião do que nos cornos uterinos de éguas não gestantes ($1,03 \pm 0,11$). A expressão gênica de prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2) tendeu a ser maior nos cornos uterinos combinados de éguas não gestantes ($1,49 \pm 0,28$) do que no corno uterino com ($0,74 \pm 0,20$) e sem o embrião ($0,76 \pm 0,17$). A expressão gênica para PTGES foi maior no corno uterino com ($1,40 \pm 0,10$) do que sem ($0,89 \pm 0,10$) o embrião e maior do que nos cornos uterinos de éguas não gestantes ($1,06 \pm 0,10$).

Éguas gestantes (n = 13) vs éguas não gestantes (n = 10)

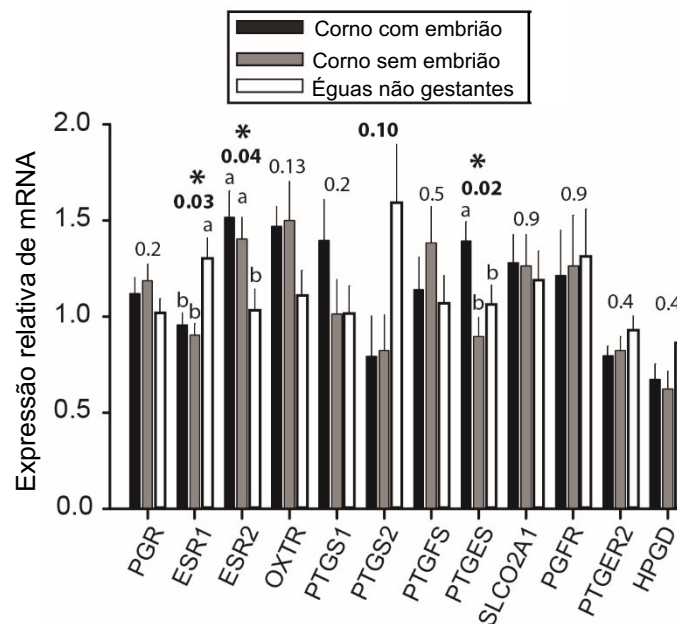


Figura 12. Média \pm SEM para expressão relativa de mRNA no corno uterino com o embrião, corno uterino sem o embrião e nos cornos uterinos de éguas não gestantes. A probabilidade para uma diferença entre os cornos é mostrada para cada gene. PGR, receptor de progesterona; ESR1, receptor de estradiol alfa; ESR2, receptor estradiol beta; OXTR, receptor de ocitocina; PTGS1, prostaglandina-endoperóxido sintase 1; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintase 2; PTGFS, prostaglandina F2alfa-sintase; PTGES, prostaglandina E2 sintase; SLCO2A1, membro da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto 2A1 (transportador de prostaglandina F); PGFR, receptor de prostaglandina F2 α ; PTGER2, receptor de prostaglandina E2; HPGD, hidroxiprostaglandina desidrogenase. Um asterisco (*) indica uma diferença significativa entre os dois cornos uterinos. (a,b) Letras diferentes há diferença significativa (P < 0.05).

4.6 DISCUSSÃO

A coleta de amostras endometriais para avaliação da expressão gênica tem sido realizada principalmente por biópsia (WEBER et al., 2021); no entanto, publicações recentes mostraram que uso de escova citológica é um método eficiente para coleta de amostras endometriais *in vivo* para avaliar a expressão gênica em células epiteliais luminais em bovinos (CARDOSO et al., 2017; DOMINGUES et al., 2020) e equinos (WEBER et al., 2021). A coleta de amostras endometriais com escova citológica é uma técnica considerada de fácil execução e permite a coleta de amostras em partes específicas do útero e próximo ao embrião equino. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avalia a expressão gênica endometrial em éguas considerando a localização intercornual do embrião móvel. O lado do CL também foi considerado em éguas gestantes e em éguas não gestantes.

No grupo de éguas não gestantes, a coleta de amostras endometriais no dia 12 precedeu o início da luteólise em todas as éguas com base no diâmetro do CL e na porcentagem de sinais de fluxo sanguíneo do CL que foram semelhantes ao período anterior ao início da luteólise (GINTHER, 2007). A progesterona modula a função endometrial (AURICH, 2011), e o receptor de progesterona (PGR) é expresso de forma diferente com base no lado do CL funcional em vacas (ARAÚJO et al., 2016) e ovelhas (SOSA et al., 2006). A ausência de diferenças na expressão gênica entre o corno uterino ipsilateral e contralateral ao CL nas éguas

não gestantes, pelo menos um dia antes do início da luteólise, sugere que o lado do CL não teve um efeito unilateral na expressão gênica dos genes endometriais de receptores e enzimas relacionados com a síntese de prostaglandinas e luteólise. Esses resultados em éguas não gestantes são consistentes com um estudo em que nenhum efeito unilateral do CL na expressão gênica endometrial de PGR e receptor de estrogênio α (ESR1) foi encontrado antes da luteólise (KALPOKAS et al., 2018).

A hipótese de que o embrião regula positivamente a síntese de PGE2 e PGF2 α localmente no endométrio adjacente ao embrião no grupo éguas gestantes, mas não nos cornos uterinos de éguas não gestantes, foi parcialmente suportada. Maior expressão do gene envolvido na síntese de PGE2 (PTGES) ocorreu no corno uterino com o embrião do que no corno uterino sem o embrião. A falta de uma diferença local semelhante na expressão da síntese de PGF2 α (PTGFS) indicou que o embrião estimulou localmente a produção de PGE2 endometrial, mas não estimulou localmente a produção de PGF2 α . *In vitro*, o embrião libera PGE2 e PGF2 α após o dia 10, e as concentrações de PGE2 no saco vitelino do embrião são cinco vezes maiores do que as concentrações de PGF2 α (STOUT & ALLEN, 2002). Um sistema de auto-amplificação endometrial no qual o PGF2 α pode estimular sua própria produção foi proposto em éguas (KOZAI et al., 2016) e vacas (DOUNG et al., 2012). Portanto, a produção de PGE2 no endométrio por um sistema de auto-amplificação a partir da produção inicial de PGE2 pelo embrião deve ser investigada.

O embrião equino secreta estrogênio já no dia 10 (ZAVY et al., 2021), e o estrogênio estimula a produção de PGE2 e PGF2 α pelas células do endométrio *in vitro* (SZÓSTEK et al., 2014). O presente achado de maior expressão gênica endometrial de PTGES no corno uterino com o embrião do que no corno uterino sem o embrião pode representar uma estimulação na secreção uterina de estrogênio causado pelo estrogênio produzido pelo embrião. Um estudo recente relatou que a síntese de PGE2 e PGF2 α pelo embrião acontece em pólos opostos do embrião com base na localização do disco embrionário, e especulou que isso pode ser responsável pelo movimento da vesícula embrionária em uma determinada direção (BIDIK et al., 2021). Portanto, mais de um fator pode estar envolvido na mobilidade embrionária e estudos futuros em um único projeto envolvendo células endometriais e embrionárias são necessários para diferenciar a função local do PGE2 e PGF2 α nas contrações uterinas e a função do estrogênio na mobilidade embrionária.

A expressão gênica de estrogênio e P4 no endométrio de égua são estimuladas pelo estrogênio e reguladas negativamente pela P4 (SILVA et al., 2014). A expressão de PGR não é diferente entre éguas gestantes e éguas não gestantes no dia 14 (HARTT et al., 2005; DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015); no entanto, PGR é mais expressado em éguas não gestantes do que em éguas gestantes no dia 17 (HARTT et al., 2005) e no dia 21 (DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015). Nosso estudo não encontrou diferença na expressão gênica de PGR entre éguas não gestantes e éguas gestantes em amostras coletadas no dia 12, que foi antes da luteólise. As concentrações de P4 em éguas da mesma raça utilizada no presente estudo não foram diferentes entre éguas gestantes e não gestantes até o início da luteólise no dia 13 em éguas não gestantes (CASTRO et al., 2021). Portanto, não houve indicação de diferença na expressão gênica de PGR entre éguas não gestantes e éguas gestantes no dia anterior à luteólise.

A menor expressão gênica de ESR1 no grupo de éguas não gestantes do que no grupo éguas gestantes está de acordo com relatos de publicações anteriores de que em éguas gestantes a supressão na expressão gênica de ESR1 ocorre nos dias 10 (MCDOWELL et al., 1999) e 12 (KLOHONATZ et al., 2015). O ESR1 desempenha um papel importante no efeito uterotrófico do estrogênio (LUBAHN et al., 1993), e uma diminuição da ESR1 tem sido descrita como um dos reguladores da resposta lútea durante a gestação em éguas (KLEIN et al., 2010). Em éguas, a ocitocina (sintetizada como o precursor inativo de ocitocina-neurofisina I; OTNP1) se liga ao seu receptor para desencadear a síntese e secreção de PGF do endométrio (STARBUCK et al.,

1998), e o tratamento de ocitocina por via intravenosa demonstrou causar a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ em éguas não gestantes (SANTOS et al., 2015b). Além disso, o estrogênio está associado à regressão lútea com base em uma correlação positiva de ocitocina-neurofisina I (OTNP1) e aumento na concentração de estradiol (BEHRENDT-ADAM et al., 1999). Outra interpretação para a expressão reduzida de ESR1 em éguas gestantes é que as grandes quantidades de estrogênio sintetizadas pelo embrião levam à regulação negativa de ESR1 no início da gestação, como sugerido anteriormente (KLEIN et al., 2010). A ausência de regulação negativa no gene OXTR em nosso estudo é consistente com relatos anteriores nos quais os receptores de ocitocina em éguas foram aumentados apenas durante a luteólise (BEHRENDT-ADAM et al., 1999) e estro (SILVA et al., 2014). Similaridade na expressão gênica de OXTR endometrial entre éguas não gestantes e éguas gestantes no dia 12 (antes da luteólise) foi relatado anteriormente (SHARP et al., 1997).

A menor expressão gênica de ESR1 no corno uterino ipsilateral ao CL em éguas gestantes foi relatada no dia 13 (KALPOKAS et al., 2018). Foi discutido que a menor expressão do gene ESR1 no corno ipsilateral ao CL poderia estar associada a um aumento unilateral na concentração de P4 no corno ipsilateral ao CL e à regulação negativa da expressão do gene ESR1 causado pelo P4. No entanto, nosso estudo não encontrou nenhuma diferença na expressão do gene ESR1 entre o corno ipsilateral e contralateral ao CL no grupo éguas não gestantes e nenhuma diferença na expressão gênica de PGR no grupo éguas gestantes que poderia estar associada à redução da expressão de ESR1. A maior expressão gênica do receptor de estrogênio β (ESR2) em éguas gestantes do que em éguas não gestantes, tendência para maior expressão gênica do gene ESR2 no corno ipsilateral do que contralateral ao CL em éguas gestantes e tendência para maior expressão do gene ESR2 no corno uterino com do que sem o embrião podem estar relacionado a indicações semelhantes para camundongos (WEIHUA et al., 2000) e novilhas (DOMINGUES et al., 2020). Nessas espécies, foi indicado que o ESR2 pode ter a função de inibir a ação do ESR1 no útero. Nenhuma diferença foi encontrada entre éguas não gestantes e éguas gestantes em relação a expressão de ESR2 nos dias 7, 14 e 21 (DE RUIJTER-VILLANI et al., 2015). No presente estudo, os resultados de ESR1 e ESR2 não fizeram parte da hipótese e não esclareceram adequadamente se há uma relação entre o lado do embrião ou o lado do CL na síntese endometrial de ESR1 e ESR2 em éguas; estudos futuros são necessários.

A tendência de menor expressão gênica de PTGS2 no grupo de éguas gestantes do que no grupo de não gestantes pode representar o início da regulação negativa da expressão de PTGS2 atribuível a presença do embrião. A expressão de PTGS2 no endométrio está associada à produção de prostaglandina (SMITH et al., 1996) e foi mostrado em ser regulado positivamente durante o tempo esperado de luteólise em éguas não gestantes. Em éguas gestantes, uma regulação negativa de PTGS2 é essencial para prevenir a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (BOERBOOM et al., 2004, ATLI et al., 2010; EARLY et al., 2010).

A maior expressão gênica endometrial para PTGES, mas não para PTGFS, no corno uterino com embrião do que nos cornos uterinos de éguas não gestantes, indicou que apenas PTGES foi produzido localmente pelo endométrio adjacente ao embrião. Além disso, diferença na expressão gênica endometrial de PTGES entre éguas gestantes e não gestantes foi confirmada antes da luteólise em um estudo (ATLI et al., 2007), mas não em outro estudo no dia 15 (BOERBOOM et al., 2004). No entanto, nenhum dos estudos mencionados anteriormente considerou a localização do embrião durante a coleta da amostra de biópsia endometrial. O presente estudo enfatiza a importância da localização do embrião nas análises de expressão gênica no endométrio. A não diferença entre os grupos éguas não gestantes e éguas gestantes dos genes envolvidos na síntese, transporte, sinalização e metabolismo de PGF (PTGFS, SLCO2A1, PGFR, HPGD) indica que o embrião não influencia localmente a expressão desses genes no dia 12 antes do início de luteólise.

4.7 CONCLUSÕES

Amostras coletadas por escova citológica no seguimento médio de cada corno uterino durante a mobilidade do embrião em éguas indicam um efeito local do embrião na expressão gênica no endométrio adjacente ao embrião. A regulação positiva de PTGES apenas no corno uterino com o embrião e a ausência de resultados semelhantes para PTGFS, demonstram que o embrião móvel regula positivamente a síntese de PGE2 no endométrio adjacente ao embrião, mas não regula positivamente a síntese de PGF2 α . A diferença na expressão gênica endometrial entre o corno uterino com e sem o embrião enfatiza a importância da localização do embrião móvel nas análises de expressão gênica no endométrio.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Para nosso conhecimento esse foi o primeiro estudo que comparou as concentrações diárias e pulsos de PGFM associado as concentrações plasmáticas de P4 entre o período interovulatório de éguas não gestantes e os correspondentes dias em éguas gestantes. Pulsos de baixo amplitude de PGFM ocorre em éguas gestantes durante os dias de luteólise em éguas não gestantes.

A coleta *in vivo* de amostras endometriais com escova citológica permitiu a avaliação da expressão gênica no epitélio luminal endometrial em éguas assim como a avaliação das concentrações de mRNA endometrial de genes associados a hormônios esteroides e a síntese de prostaglandinas entre os cornos uterinos de éguas não gestantes e éguas gestantes. Este estudo considerou pela primeira vez a avaliação da expressão gênica endometrial de genes associados a síntese de PGF através da coleta de amostras com escova citológica. A regulação positiva da síntese de PTGE2 apenas no corno uterino com o embrião e a ausência de resultados semelhantes para síntese de PTGF2 α , indica que o embrião móvel regula positivamente a síntese de PGE2 no endométrio adjacente ao embrião. Pesquisas futuras em um único projeto envolvendo células endometriais e embrionárias são necessários para diferenciar a função local do PGE2 e PGF2 α nas contrações uterinas e a função do estrogênio na mobilidade embrionária.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically detected uterine pathology on fertility in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. **Supplement**, v.35, p.445–454, 1987.

ALBRECHT, B.A.; DAELS, P.F. Immunolocalization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase and cytochrome P450 aromatase in the equine corpus luteum of diestrus and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.111, p.127–133, 1997.

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

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

ARAÚJO, E.R.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; MESQUITA, F.S.; MEMBRIVE, C.M.; ET AL. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. *Reproduction, Fertility and Development*, v.28, p.1533–1544, 2016.

ATLI, M.O.; KURAR, E.; KAYIS, S.A.; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, S.; et al. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.124–132, 2010.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, v.124, p.220–228, 2011.

AURICH, S.; BUDIJK. Early pregnancy in the horse revisited – does exception prove the rule? *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.6, p.50, 2015.

BAIRD, D.T. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.95–102, 1992.

BAZER, F.W.; THATCHER, W. W. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂ α by the uterine endometrium. *Prostaglandins*, v.14, p.397–401, 1977.

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

BAZER, F.W., WU G., SPENCER T. E., JOHNSON G. A., BURGHARDT R. C., AND BAYLESS K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction*, v. 16, p.135–152, 2010.

BAZER, F.W. History of maternal recognition of pregnancy. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, v.216, p.5–25, 2015.

- BEHRENDT-ADAM, C.Y.; ADAMS, M.H.; SIMPSON, K.S.; MCDOWELL, K.J. Oxytocin-neurophysin I mRNA abundance in equine uterine endometrium. **Domestic Animal Endocrinology**, v.16, p.183–192, 1999.
- BERGFELT, D.R.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 21, p.261–270, 1989.
- BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.16, p.66–72, 1996.
- BERGFELT, D.R.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v.65, p.426–432, 2001.
- BERGLUND, L.A.; SHARP, D.C.; VERNON, M.W.; THATCHER, W.W. Effect of pregnancy and collection technique on prostaglandin F in the uterine lumen of pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. v.32, p.335–341, 1982.
- BERTAN, C.M; BINELI, M; MADUREIRA, E.H; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise-revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.824–840, 2006.
- BETTERIDGE, K.J.; EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P.F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v.135, p.191–209, 1982.
- BOERBOOM, D.; BROWN, K.A.; VAILLANCOURT, D.; POITRAS, P.; GOFF, A.K.; WATANABE, K.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.70, p.391–399, 2004.
- BUDIK, S.; LUSSY, H.; AURICH, C. Quantification of different type I interferon transcripts in equine embryos at days 10 to 16 of gestation. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.307–308, 2010.
- BUDIK, S.; WALTER, I.; LEITNER, M.C.; ERTL, R.; AURICH, C. Expression of enzymes associated with prostaglandin synthesis in quine conceptuses. **Animals. Animals**, v.11, p.1180, 2021.
- CARDOSO, B.; OLIVEIRA, M.L.; PUGLIESI, G.; BATISTA, E.; BINELLI, M. Cytobrush: A tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, p.1153–1157, 2017.
- CASTRO, T.; OLIVEIRA, F.A.; SIDDIQUI, M.A.; BALDRIGHI, J.M.; WOLF, C.A.; GINTHER, O.J. Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. **Theriogenology**, v.85, p.740–746, 2016.

CASTRO, T.; JACOB, J.C.; STEFANI, G.; DOMINGUES, R.R.; GINTHER, O.J. Concentrations of progesterone and a PGF 2α metabolite during the interovulatory interval compared to the corresponding days of pregnancy in mares. **Theriogenology**, v.165, p.10–17, 2021.

CHOI, I.; COLLANTE, W. R.; SIMMEN, R. C.; SIMMEN, F. A. A developmental switch in expression from blastocyst to endometrial/placental-type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse. **Biology of Reproduction**, v.56, p.688–696, 1997.

CROSS, D.T.; GINTHER, O.J. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. **Journal of Animal Science**, v.66, p.250–254, 1988.

DE RUIJTER–VILLANI, M.; VAN TOL, H.T.; STOUT, T.A. Effect of pregnancy on endometrial expression of luteolytic pathway components in the mare. **Reproduction, Fertility and Development**, v.27, p.834–845, 2015.

DHINDSA, D. S., AND DZIUK P. J. Effect on pregnancy in the pig after killing embryos or fetuses in one uterine horn in early gestation. **Journal of Animal Science**, v.27, p.122–126, 1968.

DOMINGUES, R.R.; GINTHER, O.J.; GOMEZ–LEÓN, V.E.; WILTBANK, M.C. Up–regulation of endometrial oxytocin receptor is associated with the timing of luteolysis in heifers with two and three follicular waves†. **Biology of Reproduction**, v.102, p.316–326, 2020.

DOUGLAS, R.H.; GINTHER, O.J. Effect of prostaglandin-F 2α on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, v.2, p.265–268, 1972.

DOUGLAS, R.H.; GINTHER, O.J. Route of prostaglandin F 2α injection and luteolysis in mares. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.148, p.263–269, 1975.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins**, v.11, p.251–260, 1976.

DUONG, H.T.; VU, H.V.; BAH, M.M.; WOCLAWEK–POTOCKA, I.; DAM, T.V.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K.; ACOSTA, T.J. Acute changes in the concentrations of prostaglandin F 2α (PGF) and cortisol in uterine and ovarian venous blood during PGF–induced luteolysis in cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.238–243, 2012.

DZIUK, P. J., POLGE C., ROWSON L. E., DZUIK P. J., POLGE C., AND ROWSON L. E. Intra-uterine migration and mixing of embryos in swine following egg transfer. **Journal of Animal Science**, v.23, p.37–42, 1964.

EALY, A.D.; EROH, M.L.; SHARP, D.C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.99–105, 2010.

ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJÖLD, M.; GUSTAFSSON, J. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.82, p.4258–4265, 1997.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.105–111, 2011.

FERREIRA, J.C.; BOAKARI, Y.L.; ROCHA, N.S.; IGNACIO, F.S.; DA COSTA, G.B.; DE MEIRA, C. Luteal vascularity and embryo dynamics in mares during early gestation: Effect of age and endometrial degeneration. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, p.571–579, 2019.

FRANCZAK, A.; ZMIJEWSKA, A.; KUROWICKA, B.; WOJCIECHOWICZ, B.; KOTWICA, G. Interleukin 1 β -induced synthesis and secretion of prostaglandin E2 in the porcine uterus during various periods of pregnancy and the estrous cycle. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.16, p.733–742, 2010.

GARDNER, M. L.; FIRST, N. L.; CASIDA, L. E. Effect of exogenous estrogens on corpus luteum maintenance in gilts. **Journal of Animal Science**, v.22, p.132–134, 1963.

GASTAL, E.L.; BERGFELT, D.R.; NOGUEIRA, G.P.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1492–1498, 1999.

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; TORRES, C.A.; GINTHER, O.J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v.50, p.989–999, 1998.

GINTHER, O.J.; FIRST, N.L. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, p.1687–1691, 1971.

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

GINTHER, O.J. Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. **Theriogenology**, v.21, p.633–644, 1984a.

GINTHER, O.J. Mobility of twin embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**, v.22, p.83–95, 1984b.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, v.21, p.505–516, 1984.

GINTHER, O.J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, v.17, p.41–47, 1985.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in The Mare**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1986. 378p.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. 2^a edition. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals. book 1**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995a. 225p.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses. Book 2**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995b. 394p.

GINTHER, O.J. Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. **Proceeding of American Association of Equine Practitioners**, v.44, p.73–104, 1998.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, p.516–526, 2004.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v.130, p.379–88, 2005.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.144–150, 2006.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.213–220, 2007a.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-doppler Ultrasonography. Book 4**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007. 258p.

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506–513, 2007b.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone concentrations in mares. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.197–203, 2007c.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.8, p.454–460, 2008a.

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L.; FERREIRA, J.C.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.684–293, 2008b.

GINTHER, O.J. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. **Theriogenology**, v.72, p.591–598, 2009.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A. Concentrations of circulating hormones normalized to pulses of a prostaglandin F2alpha metabolite during spontaneous luteolysis in mares. **Theriogenology**, v.72, p.1111–1119, 2009.

GINTHER, O.J.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. Progesterone responses to intravenous and intrauterine infusions of prostaglandin F2α in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.688–695, 2009.

GINTHER, O.J.; SHRESTHA, H.K.; BEG, M.A. Circulating hormone concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F2α during preluteolysis and early luteolysis in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.253–258, 2010a.

GINTHER, O.J.; SHRESTHA, H.K.; FUENZALIDA, M.J.; SHAHIDUZZAMAN, A.K.M.; BEG, M.A. Characteristics of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2alpha before, during, and after spontaneous luteolysis and temporal intrapulse relationships with progesterone concentrations in cattle. **Biology of Reproduction**, v.82, p.1049–1056, 2010b.

GINTHER, O.J.; SHRESTHA, H.K.; FUENZALIDA, M.J.; SHAHIDUZZAMAN, A.K.M HANNAN, M.A.; BEG, M.A. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F2α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. **Theriogenology**, v.74, p.1179–1186, 2010c.

GINTHER O.J.; BEG, M.A. Hormone concentration changes temporally associated with the hour of transition from preluteolysis to luteolysis in mares. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.67–72, 2011.

GINTHER, O.J.; HANNAN, M.A.; BEG, M.A. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF2α, progesterone, LH, and estradiol in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.41, p.174–184, 2011a.

GINTHER, O.J.; RODRIGUEZ, M.B.; BEG, M.A. Concentrations of circulating hormones during the interval between pulses of a PGF2α metabolite in mares and heifers. **Animal Reproduction Science**, v.128, p.22–28, 2011b.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: A comparison between cattle and horses. **Biology of Reproduction**, v.86, p.1–12, 2012a.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A. The hour of transition into luteolysis in horses and cattle: A species comparison. **Theriogenology**, v.77, p.1731–1740, 2012b.

GINTHER, O.J.; PINAFFI, F.L.; SILVA, L.A.; BEG, M.A. Temporal relationships of a pulse of prolactin (PRL) to a pulse of a metabolite of PGF2α in mares. **Theriogenology**, v.77, p.99–107, 2012.

GINTHER, O.J.; BALDRIGHI, J.M.; CASTRO, T.; WOLF, C.A.; SANTOS, V.G. Concentrations of progesterone, a metabolite of PGF2 alpha, prolactin, and luteinizing hormone during development of idiopathic persistent corpus luteum in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.55, p.114–122, 2016a.

GINTHER, O.J.; CASTRO, T.; BALDRIGHI, J.M.; WOLF, C.A.; SANTOS, V.G. Defective secretion of prostaglandin F₂ α during development of idiopathic persistent corpus luteum in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.55, p.60–65, 2016b.

GOLDSTEIN, J. R. Ultrasound-guided peripheral venous access. **Israeli Journal of Emergency Medicine**, v.6, n.4, p.46–52, 2006.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v.34, p.47–56, 1990.

GRIFFIN, P.G.; CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.311–29, 1993.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. **Theriogenology**, v.39, p.997–1008, 1993.

GUTHRIE, H.D.; REXROAD, C.E. Endometrial prostaglandin f release *in vitro* and plasma 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂ α in pigs with luteolysis blocked by pregnancy, estradiol benzoate or human chorionic gonadotropin. **Journal of Animal Science**, v.52, p.330–339, 1981.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HALUSKA, G.J.; CURRIE, W.B. Variation in plasma concentrations of oestradiol-17 beta and their relationship to those of progesterone, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 alpha and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.84, p.635–646, 1988.

HARTT, L.S.; CARLING, S.J.; JOYCE, M.M.; JOHNSON, G.A.; VANDERWALL, D.K.; OTT, T.L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v.130, p. 241–50, 2005.

HANSEN T.R.; HENKES, L.K.; ASHLEY, R.L.; BOTT, R.C.; ANTONIAZZI, A.Q.; HAN, H. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. **Society for Reproduction and Fertility**, v.67, p.325–340, 2010.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; YEATS, B. F. Relationship between body condition score, physical measurements, and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p.371–372, 1983.

HIROI, H.; INOUE, S.; WATANABE, T.; GOTO, W.; ORIMO, A.; MOMOEDA, M.; et al. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.22, p.37–44, 1999.

HOUSTO, P. L. Correlated Photochemistry: The Legacy of Johann Christian Doppler. **Accounts of Chemical Research**, v.22, p.309–314, 1989.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Efetivo do rebanho equino 2017. Acesso em: 07 de janeiro de 2022.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção de Pecuária Municipal 2020. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/84/ppm_2020v48.pdf. Acesso em: 07 de janeiro de 2022.

ING, N.H.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. **Biology of Reproduction**, v.54, p.591–599, 1996.

JACOB, J.C.; HAAG, K.T.; SANTOS, G.O.; OLIVEIRA, J.P.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.77, p.1159–166, 2012.

KALPOKAS, I.; MATTOS, R.C.; CAVESTANY, D.; MARTÍNEZ, M.N.; PERDIGÓN, F.; MEIKLE, A. Effect of side of the corpus luteum and pregnancy on estrogen and progesterone receptor expression and localization in the endometrium of mares. **Theriogenology**, v.114, p.221–228, 2018.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction**, v.1, p.515–517.

KELLY, C.M.; HOYER, P.B.; WISE, M.E. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.84, p.593–600, 1988.

KLEIN, C.; SCOGGIN, K.E.; EALY, A.D.; TROEDSSON, M.H. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.83, p.102–113, 2010.

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

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

KLEIN C. Novel equine conceptus-endometrial interactions on day 16 of pregnancy based on RNA sequencing. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, p.1712–1720, 2015.

KLEIN, C. Early pregnancy in the mare: old concepts revisited. **Domestic Animal Endocrinology**, v.46, p.212–277, 2016.

KLOHONATZ, K.M.; HESS, A.M.; HANSEN, T.R.; SQUIRES, E.L.; BOUMA, G.J.; BRUEMMER, J.E. Equine endometrial gene expression changes during and after maternal recognition of pregnancy. **Journal of Animal Science**, v.93, p.3364–3376, 2015.

KOZAI, K.; TOKUYAMA, S.; SZOSTEK, A.Z.; TOISHI, Y.; TSUNODA, N.; TAYA, K.; SAKATANI, M.; TAKAHASHI, M.; NAMBO, Y.; SKARZYNSKI, D.J.; YAMAMOTO, Y.; KIMURA, K.; OKUDA, K. Evidence for a PGF (2 alpha) auto-amplification system in the endometrium in mares. **Reproduction**, v.151, p.517–526, 2016.

LEITH, G.S.; GINTHER, O.J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v.22, p.401–408, 1984.

LEITH, G.; GINTHER, O. Mobility of the conceptus and uterine contractions in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.701–711, 1985.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real–time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

LUBAHN, D.B.; MOYER, J.S.; GOLDING, T.S.; COUSE, J.F.; KORACH, K.S.; SMITHIES, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p.11162–11166, 1993.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Disponível em: <http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-antecedentes/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine–mediated event. **Physiological Reviews**, v.79, p.263–323, 1999.

MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of Reproduction**, v.39, p.340–348, 1988.

MCDOWELL, K.J.; ADAMS, M.H.; ADAM, C.Y.; SIMPSON, K.S. Changes in equine endometrial oestrogen receptor alpha and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.135–142, 1999.

MCDOWELL, K.; SHARP, D. **Maternal recognition of pregnancy**. In MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D., editors. *Equine Reproduction*. Second edition, Oxford: Wiley-Blackwell, p.2200–2210, 2011.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2^a edition, Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.

MEZERA, M.A.; HAMM, C.S.; GAMARRA, C.A.; GENNARI, R.S.; PRATA, A.B.; SARTORI, R.; WILTBANK, M.C. Profiles of prostaglandin F2 α metabolite in dairy cattle during luteal regression and pregnancy: implications for corpus luteum maintenance. **Biology of Reproduction**, v.101, p.76–90, 2019.

MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**. v.34, p.51–60, 2002

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.245–262, 2000.

- NEEDLEMAN, P.; JAKSCHIK, B.A.; MORRISON, A.R.; LEFKOWITH, J.B. Arachidonic acid metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v.55, p.69–102, 1986.
- NEELY, D.P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E.; HUGHES, J.P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, p.181–189, 1979.
- NIETO-OLMEDO, P.; MARTÍN-CANO, F.E.; GAITSKELL-PHILLIPS, G.; ORTIZ-RODRÍGUEZ, J.M.; PEÑA, F.J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C. Power Doppler can detect the presence of 7–8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.145, p.1–9, 2020.
- NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v.123, n.3, p.333–339, 2002.
- OLIVEIRA, R.A.; YAMIM, R.S.; PIVATO, I.; RAMOS, A.F. Sexagem fetal em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, p.37–42, 2014.
- ORIOLE, J.G.J.; SHAROM, F.J.F.; BETTERIDGE, K.J.K. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.653–664, 1993.
- PARKINSON, T.J.; LAMMING, G.E. Interrelationships between progesterone, 13,14-dihydro-15-keto PGF-2 alpha (PGFM) and LH in cyclic and early pregnant cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.221–233, 1990.
- PINAFFI, F.L.V.; ARAUJO, E.R.; GINTHER, O.J. Concentrations of a PGF 2α metabolite during pregnancy on the days that luteolysis occurs in nonbred heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.62, p.76–82, 2018.
- PIOTROWSKA-TOMALA, K.K.; JONCZYK, A.W.; SKARZYNSKI, D.J.; SZÓSTEK-MIODOCHOWSKA, A.Z. Luteinizing hormone and ovarian steroids affect *in vitro* prostaglandin production in the equine myometrium and endometrium. **Theriogenology**, v.153, p.1–8, 2020.
- REBORDÃO, M.R.; GALVÃO, A.; PINTO-BRAVO, P.; PINHEIRO, J.; GAMBOA, S.; SILVA, E. et al. Endometrial prostaglandin synthases, ovarian steroids, and oxytocin receptors in mares with oxytocin-induced luteal maintenance. **Theriogenology**, v.87, p.193–204, 2017.
- RIGBY, S.L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R.C.; COLLERAN, P.; HOMPSON, J.A.; VARNER, D.D.; et al. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. **Biology of Reproduction**, v.65, p.740–747, 2001.
- ROSS, G.T. Human chorionic gonadotropin and maternal recognition of pregnancy. **Ciba Foundation Symposium**, v.64, p.191–208, 1978.
- SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.43, p.53–64, 2002.

- SANTOS, V.G.; BEG, M.A.; BETTENCOURT, E.M.; GINTHER, O.J. Role of PGF 2α in luteolysis based on inhibition of PGF 2α synthesis in the mare. **Theriogenology**, v.80, p.812–2013.
- SANTOS, V.G.; BETTENCOURT, E.M.; GINTHER, O.J. Hormonal, luteal, and follicular changes during initiation of persistent corpus luteum in mares. **Theriogenology**, v.83, p.757–765, 2015a.
- SANTOS, V.G.; CASTRO, T.; BETTENCOURT, E.M.; GINTHER, O.J. Oxytocin induction of pulses of a prostaglandin metabolite and luteolysis in mares. **Theriogenology**, v.83, p.730–738, 2015b.
- SATUÉ, K.; GARDÓN J.C. A Review of the Estrous Cycle and the Neuroendocrine Mechanisms in the Mare. **Journal of Steroids and Hormonal Science**, v.4, p.115, 2013.
- SCHULTZ, J.F.; ARMANT, D.R. Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri- implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor. **Journal of Biology Chemistry**, v.270, p.11522–11531, 1995.
- SCHUSTER, V.L. Prostaglandin transport. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.68–69, p.633–47, 2002.
- SHARP, D.C.; BLACK, D.L. Changes in peripheral plasma progesterone throughout the oestrous cycle of the pony mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.33, p.535–538, 1973.
- SHARP, D.C.; ZAVY, M.T.; VERNON, M.W.; BAZER, F.W.; THATCHER, W.W.; BERGLUND, L.A. The role of prostaglandins in the maternal recognition of pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, v.7, p.269–282, 1984.
- SHARP, D.C.; THATCHER, M.J.; SALUTE, M.E.; FUCHS, A.R. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F 2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.137–44, 1997.
- SHORT, R.V. **Implantation and the maternal recognition of pregnancy**. In: Wolstenholme, G.E.W.; O'CONNOR (EDS), *Fetal Autonomy*, London, p.2–26, 1969.
- SHRESTHA, H.K.; BEG, M.A.; BURNETTE, R.R.; GINTHER, O.J. Plasma clearance and half-life of prostaglandin F 2 alpha: A comparison between mares and heifers. **Biology of Reproduction**, v.87, p.1–6, 2012.
- SILVA, E.S.; SCOGGIN, K.E.; CANISSO, I.F.; TROEDSSON, M.H.; SQUIRES, E.L.; BALL, B.A. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E 2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.169–181, 2014.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v.72, p.755–761, 2005.

SILVA, M.S. J.; LIMA, R.S.; SILVA, M.J.S.; LUCENA, J.E.C.; CARNEIRO, G.F.; NASCIMENTO, G.; JOBIM, C.C. Avaliação comportamental de éguas estabuladas em período reprodutivo. **Revista Ciência Agronômica**, v.14, n.1, p.46-54, 2015.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)–1 and –2. **Journal of Biology Chemistry**, v.271, p.33157–33160, 1996.

SOSA, C.; ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; VIÑOLES, C.; TASENDE, C.; VALARES, J.A.; et al. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.447–458 2006.

SPENCER, T. E.; FORDE, N.; DORNIK, P.; HANSEN, T. R.; ROMERO, J. J.; LONERGAN, P. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. **Reproduction**, v.146, p.377–387, 2013.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. **Journal of Animal Science**, v.38, p. 823–830, 1974a.

SQUIRES, E.L.; WENTWORTH, B.C.; GINTHER, O.J. Progesterone concentration in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. **Journal of Animal Science**, v.39, p.759–767, 1974b.

STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P.; EVANS, J.W. Ovarian activity during the estrous cycle of the mare. **Endocrinology**, v.90, p.1379–1384, 1972.

STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P.; WHEAT, J.D.; EVANS, J.W.; KENNEDY, P.C.; CUPPS, P.T. The role of the uterus in ovarian control in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.37, p.343–351, 1974.

STARBUCK, G.R.; STOUT, T.A.; LAMMING, G.E.; ALLEN, W.R.; FLINT, A.P. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.173–179, 1998.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.27, p.431–440, 1979.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. The role of oxytocin in luteolysis in the cycling mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.351–354, 1999.

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

STOUT, T.A.E. **Prostaglandins**. In McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. Second edition, Oxford: Wiley-Blackwell, p.1642–167, 2011.

STOUT, T.A.E. Embryo–maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. **Theriogenology**, v.86, p.349–354, 2016.

SWEGEN, A. Maternal recognition of pregnancy in the mare: does it exist and why do we care? **Reproduction**, v.161, p.139–155, 2021.

SZÓSTEK, A.Z.; GALVÃO, A.M.; HOJO, T.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D.J. Interleukins affect equine endometrial cell function: modulatory action of ovarian steroids. **Mediators of Inflammation**, v.2014, p.208103, 2014.

TIBBETTS, T.A.; MENDOZA-MENESES, M.; O'MALLEY, B.W.; CONNEELY, O.M. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1143–1152, 1998.

TROEDSSON, M.H.; LIU, I.K.; ING, M.; PASCOE, J. Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F2 α , and prostaglandin E2 on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. **Biology of Reproduction**, v.52, p.475–488, 1995.

TSUMAGARI, S.; HIGASHINO, T.; TAKAGI, K.; OHBA, S.; SATOH, S.; TAKEISHI, M. Changes of plasma-concentrations of steroid-hormones, prostaglandin f-2-alpha-metabolite and pregnant mare serum gonadotropin during pregnancy in thoroughbred mares. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.53, p.797–801, 1991.

UTT, M.D.; ACOSTA, T.J.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Acute effects of prostaglandin F2 α on systemic oxytocin and progesterone concentrations during the mid- or late-luteal phase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.63–73, 2007.

VAN NIEKERK, C.H.; MORGENTHAL, J.C.; GERNEKE, W.H. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.23, p.171-175, 1975.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.; WEBER, J.; LICHTENWALNER, A. PGE2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.24–27, 1993.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; WEBER, J.A.; LICHTENWALNER, A.B. Corpus luteal function in nonpregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E2 or estradiol-17beta. **Theriogenology**, v.42, p.1069–1083, 1994.

VANDERWALL, D.K.; SILVIA, W.J.; FITZGERALD, B.P. Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.337–346, 1998.

VANDERWALL, D.K.; BETSCHART, R.W.; SQUIRES, E.L. Effect of PGF₂alpha and 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. **Theriogenology**, v.53, p.1263–1271, 2000.

WACLAWIK, A.; BLITEK, A.; KACZMAREK, M. M.; KIEWISZ, J.; ZIECIK, A. J. (2009). Antiluteolytic mechanisms and the establishment of pregnancy in the pig. **Society for Reproduction and Fertility**, v.66, p.307–320, 2009.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 331–336, 1989.

WATSON, E.D.; COLSTON, M.; BROADLEY, C. LH and progesterone concentrations during diestrus in the mare and the effect of hCG. **Theriogenology**, v.43, p.1325–1337, 1995.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.8, p.223–229, 1990.

WEBER, J.A.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Prostaglandin E₂ hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction**, v.45, p.544–546, 1991.

WEBER, J.A.; WOODS, G. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.36–8, 1993.

WEBER, K.S.; WAGENER, K.; BLANCO, M.; BAUERSACHS, S.; BOLLWEIN, H. A comparative analysis of the intrauterine transcriptome in fertile and subfertile mares using cytobrush sampling. **BMC Genomics**, v.22, p.1–19, 2021.

WEIHUA, Z.; SAJI, S.; MÄKINEN, S.; CHENG, G.; JENSEN, E.V.; WARNER, M.; et al. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, 5936–5941, 2000.

WHITMORE, H.L.; WENTWORTH, B.C.; GINTHER, O.J. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p.631–636, 1973.

WILLMANN, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; PARVIZI, N.; AURICH, C. Effects of age and altrenogest treatment on conceptus development and secretion of LH, progesterone and eCG in early pregnant mares. **Theriogenology**, v.75, p.421–428, 2011.

WILSHER, S.; CLUTTON-BROCK, A.; ALLEN, W.R. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction**, v.139, p.575–585, 2010.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Intrauterine administration of plant oils inhibits luteolysis in the mare. **Equine Veterinary Journal**, p.99–105, 2011.

WHITMORE, H.L.; WENTWORTH, B.C.; GINTHER, O.J. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p.631–636, 1973.

WUTTKE, W.; THEILING, K.; HINNEY, B.; PITZEL, L. Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. **Steroids**, v.63, p.299–305, 1998.

ZARCO, L.; STABENFELDT, G.H.; BASU, S.; BRADFORD, G.E.; KINDAHL, H. Modification of prostaglandin F-2 alpha synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.527–536, 1988.

ZAVY, J.T.; MAYER, R.; VERNON, M.W.; BAZER, F.W.; SHARP, D.C. An investigation of the uterine luminal environment of nonpregnant and pregnant pony mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. **Supplement**, p.403–411, 1979.



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Concentrations of progesterone and a PGF2 α metabolite during the interovulatory interval compared to the corresponding days of pregnancy in mares



T. Castro ^{a, b, c}, J.C. Jacob ^a, G. Stefani ^a, R.R. Domingues ^{b, c}, O.J. Ginther ^{b, c, *}

^a Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural Do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

^b Eutheria Foundation, Cross Plains, WI, 53528, USA

^c Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, 53706, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2020

Received in revised form

3 February 2021

Accepted 5 February 2021

Available online 11 February 2021

Keywords:

Luteolysis

Mares

PGF2 α

PGFM metabolite

Pregnancy

ABSTRACT

The concentrations of progesterone (P4) and a metabolite of PGF2 α (PGFM) in mares were compared between the interovulatory interval (IOI; n = 8) and the corresponding days of pregnancy (n = 9). In daily blood samples, P4 increased between the day of ovulation (Day 0) and ~Day 6 and then gradually decreased until the beginning of luteolysis in the IOI group. Before the beginning of luteolysis, there were no significant differences in P4 concentrations between the IOI and early pregnancy. In the IOI, PGFM concentration on the day before the beginning of luteolysis began to increase (P < 0.04) and reached a maximum mean (42.9 \pm 11.6 pg/mL) on Day 14. In pregnancy, a novel increase in PGFM occurred from Day 12 to a maximum mean on Day 15 (16.7 \pm 3.1 pg/mL). Daily PGFM concentrations were not different between the two groups until the increase just before luteolysis in the IOI. During 8-h sessions of hourly blood sampling, the mean and maximum PGFM concentrations were significantly greater in IOI than in pregnancy for each 8-h session on Days 13, 14, and 15. The minimum was not different between groups on any day. Pulses of PGFM were identified by coefficient of variation during the hourly 8-h sessions on day-sets of Days 4–7, 9–11, and 13–16. Despite the PGFM increase in daily samples between Days 12 and 15 of pregnancy, the amplitude and peaks of CV-identified pulses did not differ in the pregnant mares among the three day-sets. The pulses were similarly small for day-sets 4–7 and 9–11 in the IOI and for all day-sets in pregnancy (eg, amplitude on Days 13–16: 43.4 \pm 15.6 pg/mL vs 5.4 \pm 1.1 pg/mL for IOI vs pregnancy). Hypothesis 1 was not supported that daily PGFM concentrations in an IOI increase at the intersection between the end of the rapid P4 increase and the gradual P4 decrease. Hypothesis 2 was supported that pregnant mares have low amplitude PGFM pulses during the days of the high amplitude pulses at luteolysis in the IOI.

© 2021 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Circulating concentrations of progesterone (P4) during the interovulatory interval (IOI) in mares have been reviewed especially in association with luteolysis [1–3]. Assays of circulating concentration of P4 [4,5] and LH [6] during the IOI in mares were reported during the early 1970's. In subsequent years, the close reciprocal relationship between P4 and LH concentrations was clarified based on blood sampling every 24 h [7,8] and every 4 h [9] throughout the IOI. On Day 0 (day of ovulation) to Day 6, P4 rapidly

increases and LH decreases beginning on Day 1. Concentrations of P4 gradually decrease after Days 6–8 and rapidly decrease at the beginning of luteolysis on about Day 13 [7,8,10–12]. During the gradual P4 decrease, LH also continues to decrease and begins to increase about a day before the end of luteolysis (P4 < 1 ng/mL [7]).

Concentrations of P4 seem similar between the IOI and pregnancy until the end of the gradual decline at the beginning of luteolysis in the IOI [13–15]. Concentrations decrease precipitously during luteolysis and in pregnancy appear to continue the gradual decrease for about another week. The P4 concentrations after the apparent gradual decrease in pregnant mares remain approximately constant until an increase on ~ Day 35. The increase is from the continuation of the primary CL and formation of secondary CL

* Corresponding author. Eutheria Foundation, Cross Plains, WI, 53528, USA.
 E-mail address: oj.ginther@wisc.edu (O.J. Ginther).

in response to production of equine chorionic gonadotropin by the endometrial cups [16–18]. The continuous supply of P4 during pregnancy causes myometrial quiescence [19] and is essential for embryo survival [20].

In the 1960's and early 1970's, reports for several species including equine [21,22] indicated that the uterus produces a luteolytic factor that accounts for luteolysis. In the 1970's, PGF2 α was shown to be a uterine luteolysin in several species. In the original study in mares, a single treatment with a natural form of PGF2 α shortened the length of diestrus [23]. The presence of PGF in the blood of mares was first determined in blood taken from the main uterine vein at 4-day intervals [24]. At 14 days postestrus, concentration was highest during the IOI and was higher than at 14 days of pregnancy. Because of the short half-life of PGF2 α [25], a metabolite (PGFM) was first used in 1979 for assaying circulating concentrations of PGF2 α in mares [26]; elevated concentrations were found during luteolysis. Other studies on circulating PGFM concentrations during equine pregnancy were based on samples collected too infrequently or too late in pregnancy [27,28] for the present area of interest. Concentrations of PGF2 α in mares have also been demonstrated in uterine flushings, by incubation of endometrial tissue, and in conceptus membranes [29,30]. The PGF2 α travels from uterus to the CL ovary through a systemic route in mares [21,22,31] contrasting with a unilateral uteroluteal route in several other species including cattle.

Pulses of PGFM in mares have been characterized during the IOI [32], the hour of transition into luteolysis [33,34], and during luteolysis [35–37]. A transient increase in PGFM concentrations has been reported for Day 6 at the beginning of the gradual decrease in P4 concentrations [8]. The hour of transition at the beginning of luteolysis is characterized by a small PGFM pulse similar in amplitude to some of the earlier sporadic preluteolytic pulses [33,34]. During luteolysis [36], the PGFM pulses are more prominent and occur about every 9 h. Despite the multiple studies on PGFM pulses during the IOI, no reports were found on pulses during early equine pregnancy for the times corresponding to the IOI. In this regard, concentration of PGFM and PGFM pulses have been compared recently between the IOI and early pregnancy in heifers [38] and cows [39]. During expected luteolysis in cattle, the PGFM baseline was similar between groups and the amplitude of PGFM pulses was much lower in the pregnancy group than in the IOI. A similar study apparently has not been done in mares.

The purpose of the present study in mares was to characterize the relationships between P4 and PGFM concentrations and PGFM pulses during the IOI vs the corresponding days of early pregnancy. Concentrations of P4 and PGFM were evaluated daily on Days 0–18 of the IOI and early pregnancy with continuation until Day 24 in pregnancy. Pulses of PGFM were characterized at hourly intervals. Hypothesis 1 was that daily PGFM concentrations in an IOI increase at the intersection between the end of the rapid P4 increase and the gradual P4 decrease. Rational was from a reported unexpected observation [8]. Hypothesis 2 was that pregnant mares have low amplitude PGFM pulses during the days of the high amplitude pulses at luteolysis in the IOI. Rational was from the results of studies in heifers [38] and cows [39].

2. Material and methods

2.1. Mares and inseminations

Mangalarga Marchador nonlactating mares (n = 18) aged 5 to 14 y and weighing 370–450 kg were used from October to December in southeastern Brazil (latitude, 23°; longitude, 44°). The mares were kept under natural light on pasture and supplemented with grass hay and trace-mineralized salt with free access to water.

All mares remained healthy and in good body condition throughout the study. Abnormalities of the reproductive tract including intra-uterine fluid during diestrus (indicator of endometritis [40,41]) were not detected by transrectal ultrasonic imaging. Mares that had a second ovulation during diestrus in addition to the ovulation associated with estrus were not used. The mares were handled in accordance with the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA protocol number 0022-10-2018-CEUA).

Mares in diestrus as indicated by the presence of a mature CL were treated with 5 mg of PGF2 α (dinoprost tromethamine, Lutalyse, Zoetis, SP, Brazil) and thereafter scanned daily until a pre-ovulatory follicle of at least 35 mm and an endometrial echotextural score of 3 or 4 [40,42] were detected. Then, all mares were induced to ovulate by iv administration of 1000 IU of hCG (Vetecor, Hertape Calier®). Mares in the IOI group were not bred (n = 9). Mares that were bred and became pregnant were assigned to a pregnant group (n = 9). Artificial insemination was done 24 h after induction of ovulation. Fresh semen (20–30 mL, 500×10^6 cells/mL with progressively motile spermatozoa) was diluted in a 1:1 ratio of semen extender (Botusemen®; Botupharma, Brazil). Semen was from a single fertile Mangalarga Marchador stallion. Ovulation was determined daily, and the day of ovulation was designated as Day 0 (uppercase "D"). Pregnancy diagnosis was done by ultrasonic imaging on Day 12 and confirmed on Days 30 and 45.

2.2. Experimental design and sample collection

Transrectal ultrasonic imaging and collection of blood samples were done every 24 h from Day 0 to the next ovulation in the IOI group and until Day 24 in the pregnancy group. Daily blood samples were collected at 8:30 a.m. on each day and plasma samples were assayed for P4 and PGFM. Additionally, blood samples were collected hourly for 8-h sessions on each day during each of Days 4–7, 9–11, and 13–16 for PGFM characterization and for detection of PGFM pulses. Ultrasonic imaging was used to determine the day of ovulation, CL presence, and pregnancy. The ovulations were determined once each day between 8 and 9 a.m. The ultrasound machine (Mindray Z5-Vet; Mindray North America, Mahwah, NJ, USA) was equipped with a linear-array 7.5-MHz transrectal transducer.

Daily P4 and maximal PGFM concentrations were also normalized to the beginning and end of luteolysis as indicated by an uninterrupted rapid decline in P4. The day before a P4 decrease of $\geq 20\%$ from the previous day with an uninterrupted decrease thereafter was defined as the beginning of luteolysis (day 0B, lowercase "d"), and the first day P4 concentration decreased to < 1.0 ng/mL was defined as the end of luteolysis (day 0E) [36]. Daily blood samples were used to compare the temporal relationship between P4 and PGFM concentrations, and 8-h sessions of hourly samples were used for PGFM per session and PGFM pulses.

2.3. PGFM

The PGFM end points for the comparisons between groups (IOI and pregnancy) during the 8-h sessions of hourly sampling on Days 4–7, 9–11, and 13–16 were mean, maximum, and minimum PGFM concentrations and number of PGFM pulses. A PGFM pulse was defined by a coefficient of variation (CV) from at least four values comprising the ascending and descending portions of a fluctuation that was at least three times greater than the mean intraassay CV as described for mares [32] and cattle [38,43]. The characteristics of CV-identified pulses (nadir 1, amplitude, peak, nadir 2, interval from nadir 1 to nadir 2, and area under curve) were determined for all pulses and for the most prominent pulse within each session.

Prominence was based on the highest concentration at the pulse peak. The most prominent pulse during each day-set (Days 4–7, 9–11, 13–16) was also compared among day-sets for hours –2 to 2 (hour 0 = hour of peak).

2.4. Hormone assays

Blood samples were collected into heparinized tubes from jugular vein and placed immediately in ice water for 10 min followed by centrifugation ($2000 \times g$ for 10 min). The plasma was stored (-20°C) until assayed. The plasma samples were assayed for P4 as described and validated for mare plasma in our laboratory [44] using a solid-phase radioimmunoassay (RIA; ImmChem Coated Tube Progesterone ^{125}I RIA kit, MP Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA). The intraassay CV and sensitivity were 5.0% and 0.04 ng/mL, respectively. The concentrations of PGFM were determined by ELISA as developed for cattle [43] and adapted for mares [36]. The intraassay and interassay CVs and sensitivity for PGFM were 6.2%, 11.7%, and 1.1 pg/mL, respectively.

2.5. Statistics

Data that were not normally distributed on the basis of a Shapiro–Wilk test were resolved by transformation into natural logarithms or ranks. Data processing used the statistical analysis system (SAS) proc mixed with a repeated statement to minimize autocorrelation among sequential measurements (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary NC, USA). Determinations were made of the main effects of group and time (day and hour) and the group-by-time interaction. When an interaction was significant, Tukey's honestly significant difference test was used for comparisons between groups and between times. Student's *t*-tests were also used on a preliminary or tentative basis for comparisons of special interest when an interaction was not significant. A probability of $P \leq 0.05$ indicated a difference was significant, and a probability between $P > 0.05$ and $P \leq 0.10$ indicated that significance was approached. Differences that approached significance were included on a tentative or preliminary basis for potential consideration in future studies. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean unless otherwise indicated.

3. Results

One mare in the IOI group was omitted from the analyses owing to high outlying ($P < 0.05$) PGFM concentrations on Days 4–11. The number of mares remaining in the IOI and pregnancy groups was 8 and 9, respectively. A total of 12 mares were bred to obtain the 9 pregnancies.

The beginning of luteolysis in the IOI group was Day 13.1 ± 0.4 (SD, ± 1.2) and is shown for each individual IOI mare (Fig. 1). The beginning of luteolysis on mean Day 13 occurred in 5 of 8 individual mares. The last day that mean P4 concentrations decreased to < 1.0 ng/mL (end of luteolysis) was Day 15.4 ± 0.3 (SD, ± 0.9), and the last day in individuals was Day 17. Concentrations of P4 were compared between groups on Days 0–18; the main effect of day and the interaction of group by day were significant (Fig. 1, upper panel). Concentration was highest on Day 7 in each group and decreased ($P < 0.05$) in each group by Day 13. There was no significant difference between groups on Days 7–13. The first P4 decrease between adjacent days in the IOI group that was greater ($P < 0.05$) than for previous daily decreases occurred between Days 13 and 14. The first day of lower ($P < 0.05$) concentrations in the IOI than in pregnancy was Day 14. There was not a significant day effect for P4 for Days 13–24 of pregnancy.

Concentrations of PGFM from a single daily sample on Days

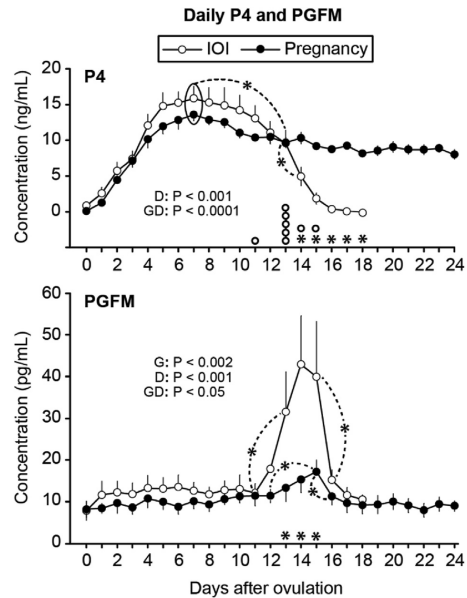


Fig. 1. Mean \pm SEM for P4 (upper panel) and PGFM (lower panel) concentrations on Days 0–18 after ovulation in the IOI and pregnancy groups with continuation until Day 24 in the pregnancy group. Probabilities that were significant for main effect of group (G) and day (D) and the interaction of group by day (GD) for each panel are shown. An open dot above the day axis of upper panel indicates the day of beginning of luteolysis for each individual mare in the IOI group. An asterisk (*) above the day axis indicates a difference ($P < 0.05$) between the two groups. An asterisk (*) in an arc between two means indicates a difference ($P < 0.05$) between the two means. IOI, interovulatory interval; P4, progesterone; PGFM, PGF2 α metabolite.

0–18 had significant main effects of group and day and an interaction of group by day (Fig. 1, lower panel). The interaction was primarily from greater concentration in the IOI than in pregnancy on Days 13–15. In the IOI group, concentration of PGFM increased ($P < 0.05$) between Days 11–13 and decreased ($P < 0.05$) between Days 15 and 16. In the pregnancy group, PGFM increased ($P < 0.05$) between Days 12–15 and decreased ($P < 0.05$) between Days 15–16. The maximal mean concentration of PGFM on Days 12–15 was 2.6 times greater during the IOI than during pregnancy.

Normalization to the day of maximal PGFM concentration (day 0) for Days 12–16 in the pregnancy group indicated only one significant difference between adjacent days on days –3 to +3 based on paired *t*-tests (not shown). The difference was for a decrease ($P < 0.006$) in P4 concentration between day 0 (10.8 ± 1.0 ng/mL) and day 1 (9.0 ± 0.9 ng/mL). Concentration of P4 between days 1 and 2 (9.4 ± 0.7 ng/mL) increased but not significantly ($P < 0.2$). Normalization to the day of maximal PGFM concentration during other day-sets (Days 4–7, 9–11) did not indicate an associated reduction in P4 during either the IOI or pregnancy (not shown). Concentrations of PGFM between Days 0–11 did not change significantly in either group or between groups and did not change for Days 16–24 in the pregnancy group.

Normalization to the beginning of luteolysis (day 0B) indicated that the first day of an increase ($P < 0.04$) in maximal PGFM concentration per day occurred on days –1 to 0B or on the day before the first daily decrease ($P < 0.05$) in P4 (Fig. 2). The difference in

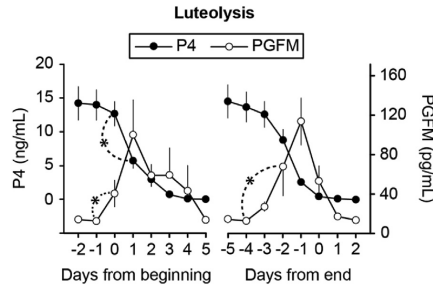


Fig. 2. Mean \pm SEM for P4 and PGFM maximal concentrations on days -2 to 5 from beginning of luteolysis (left panel) and on days -5 to 2 from the end of luteolysis (right panel) in IOI group. An asterisk (*) in an arc between two means indicates a difference ($P < 0.05$) between the two means. IOI, interovulatory interval; P4, progesterone; PGFM, PGF2 α metabolite.

maximal PGFM concentration between days -1 and $0B$ (26.7 ± 13.9 pg/mL) was less ($P < 0.03$) than the difference between days $0B$ and 1 (107.7 ± 38.1 pg/mL). When PGFM was normalized to the end of luteolysis (day $0E$), an increase in maximal PGFM began on days -4 to -2 . The greatest mean daily concentration of PGFM occurred on day -1 or the day before the end of luteolysis.

The mean and maximal concentrations of PGFM averaged for the hourly samples of the 8-h sessions on each day of each of the three day-sets are shown (Fig. 3). The group effect for each end point was from greater overall concentrations of PGFM in the IOI vs pregnancy groups for the mean (14.4 ± 1.4 vs 9.5 ± 0.5 pg/mL) and for the maximum (32.5 ± 5.0 vs 14.5 ± 0.7 pg/mL). The day effect was from greater mean and maximal concentrations of PGFM averaged over the two groups on Days $13-16$. The interaction of group by day for each of the mean and maximum was primarily from greater ($P < 0.05$) PGFM concentration in the IOI than in pregnancy on Days $13-15$ with no differences between groups on the remaining days. For minimal concentration of PGFM during the 8-h sessions, there were no significant main effects of group or day nor an interaction (combined for groups, 6.3 ± 0.4 pg/mL). For number of CV-identified PGFM pulses per 8 h, no significant differences were detected (overall, 0.7 pulses per 8 h). Based tentatively on t-tests, the number of pulses on Day 4 was greater ($P < 0.01$) in the pregnancy group than in the IOI group.

The characteristics of the most prominent CV-identified PGFM pulse from 8 h of hourly samples/day within each of three day-sets (Days $4-7$, $9-11$, $13-16$) during the IOI vs early pregnancy are shown (Table 1). The differences among day-sets of the IOI were significant or approached significance for nadir 1, amplitude, peak, nadir 2, interval from nadir 1 to nadir 2, and area under the curve. For each of these IOI end points, the value was greater ($P < 0.05$) for day-set $13-16$ than for each of day-sets $4-7$ and $9-11$. The value was greater ($P < 0.05$) for day-set $13-16$ than for the other day-sets. There was no significant difference among day-sets for the corresponding days of early pregnancy.

The mean characteristics of PGFM pulses during each 8-h session for each of Days $4-7$, $9-11$, and $13-16$ for 2 h before to 2 h after the peak for all pulses and for the most prominent pulse per day-set are shown (Fig. 4). For both all and the most prominent pulses, only the hour effect was significant for Days $4-7$ and $9-11$ from greater concentration at the peak (hour 0). For the 8-h session on Days $13-16$, the main effect of group and hour and interaction of group by hour were significant. The group effect was represented by greater average PGFM concentration in pulses of the IOI group than

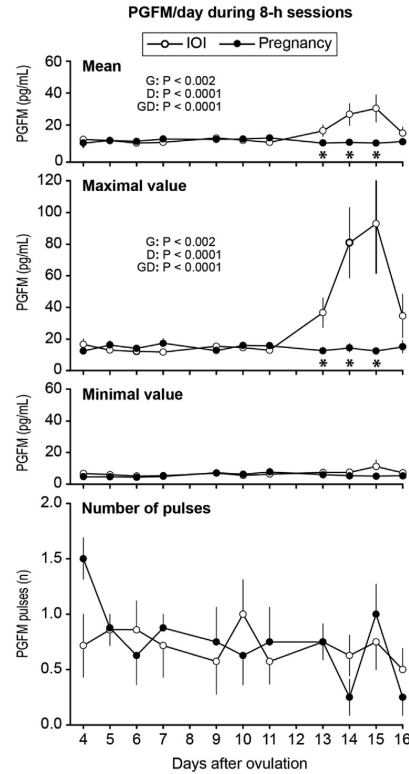


Fig. 3. Mean \pm SEM for mean, maximal, and minimal concentrations of PGFM and number of CV-identified pulses in 8-h sessions of hourly sampling for each day in IOI and pregnancy. Probabilities that were significant for main effect of group (G) and day (D) and the interaction of group by day (GD) for each panel are shown. An asterisk (*) above the day axis indicates a difference ($P < 0.05$) between the two groups. CV, coefficient of variation; IOI, interovulatory interval; PGFM, PGF2 α metabolite.

in pregnancy group. The interaction of group by hour was from a progressively greater concentration on Days $13-16$ in the IOI than in pregnancy during the ascending and descending portion of the pulse. Concentrations were greater in IOI at each of the 5 h for both all pulses and the most prominent pulses.

4. Discussion

The progressive increase in circulating P4 concentration during Days $0-6$ followed by a gradual decrease until the beginning of luteolysis primarily on Day 13 are characteristic of the IOI in mares and have been previously reported (see Introduction). Concentration of P4 during early pregnancy seems compatible with previous studies that did not directly compare P4 concentration between the IOI and pregnancy [13–15]. The similarity (absence of significant differences) between the IOI and early pregnancy in the progressive P4 increase until \sim Day 6 and the gradual decrease until Day 13 indicated that P4 is regulated by similar mechanisms in both the IOI and early pregnancy except during luteolysis in the IOI. The absence of a significant change between Days 13 and 24 in pregnancy did

Table 1
Mean ± SEM for characteristics for all CV-identified PGFM pulses from 8 h of hourly samples/day during an interovulatory interval (IOI) vs early pregnancy (Preg).

End point	Group	Day-sets for hourly sessions			Probability
		4–7	9–11	13–16	
Nadir 1 (pg/mL)	IOI	8.7 ± 1.8 ^b	7.3 ± 0.7 ^b	14.1 ± 3.0 ^{AA}	P < 0.06
	Preg	6.9 ± 0.7	7.2 ± 0.9	6.7 ± 0.9 ^B	NS
Amplitude (pg/mL)	IOI	6.4 ± 1.0 ^b	5.4 ± 0.8 ^b	43.4 ± 15.6 ^{AA}	P < 0.01
	Preg	7.3 ± 0.9	6.2 ± 0.6	5.4 ± 1.1 ^B	NS
Peak (pg/mL)	IOI	15.1 ± 2.5 ^b	12.3 ± 1.1 ^b	57.5 ± 16.3 ^{AA}	P < 0.03
	Preg	14.3 ± 1.2	13.3 ± 1.8	12.0 ± 1.4 ^B	NS
Nadir 2 (pg/mL)	IOI	8.7 ± 1.4 ^b	8.1 ± 0.9 ^b	20.0 ± 7.0 ^{AA}	P < 0.10
	Preg	6.2 ± 0.9	9.0 ± 1.0	6.1 ± 0.8 ^B	NS
Nadir 1–nadir 2 (h)	IOI	3.9 ± 0.2 ^{ab}	3.8 ± 0.2 ^b	4.5 ± 0.3 ^{AA}	P < 0.05
	Preg	4.0 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2 ^B	NS
Area under curve (pg/h/mL)	IOI	45.7 ± 8.0 ^b	39.0 ± 3.9 ^b	118.3 ± 25.4 ^{AA}	P < 0.003
	Preg	39.5 ± 3.9	39.2 ± 4.5	31.0 ± 4.2 ^B	NS

NS = not significant.

^{abc} Means within each end point (row) with a different lowercase letter are different (P < 0.05).

^{AB} Means within each end point and day-set (column) with a different uppercase letter are different (P < 0.05).

not support the apparent continuation of the P4 decrease for about another week in published profiles [13–15]. The 3-day decrease in P4 (luteolysis) in the IOI group was a consequence of averaging without regard to the occurrence of luteolysis on different days in individuals. Based on hourly examinations, the length of luteolysis requires only ~24 h in individual mares and heifers [34].

In the present study in mares, the changing P4 concentrations in the IOI from Day 0 to the end of luteolysis reflect the reciprocal relationships between P4 and reported LH concentrations during this time [7–9,36]. Maximum LH in the ovulatory surge occurs on Day 1 and then decreases during an increase in P4 until ~ Day 6. During the following gradual P4 decrease, LH also gradually

decreases and does not begin the increase of the next ovulatory surge until the day before the end of luteolysis [7]. Despite these close temporal associations between P4 and LH, it is not clear how the associations are functionally related. A negative effect of increasing P4 on LH has been demonstrated [45,46] and presumably is associated with the decline in the LH surge until ~ Day 6. The subsequent gradual decline in both P4 and LH may represent a gradual loss of a positive effect of LH on P4. A positive effect of hCG (to represent LH) on P4 has been demonstrated in vivo in mares [47]. Results of in vitro studies with luteal cells [47] and LH receptors in luteal cells [48] are consistent with a positive effect of LH on P4.

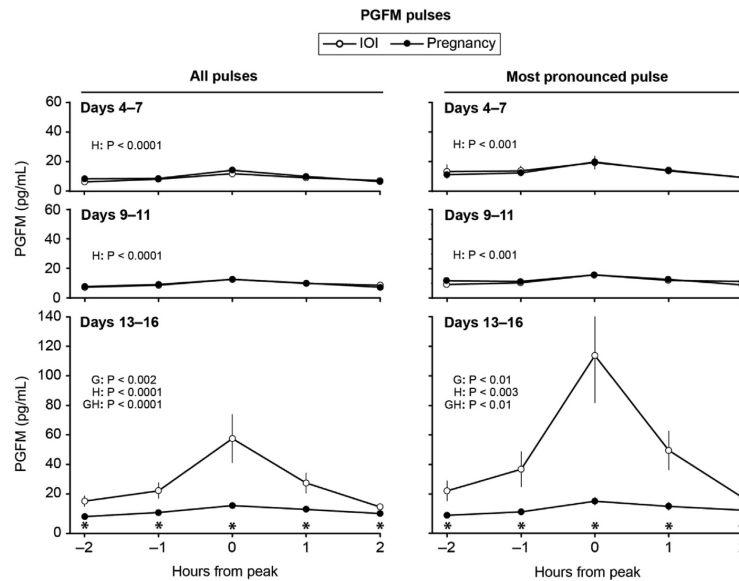


Fig. 4. Mean ± SEM for PGFM concentrations for all CV-identified pulses and for the most pronounced CV-identified pulse in 8-h sessions on each of Day-sets 4–7, 9–11, and 13–16 in IOI and pregnancy groups. For each day-set, the probabilities that were significant for main effect of group (G) and hour (H) and the interaction of group by hour (GH) for each panel are shown. An asterisk (*) above the day axis indicates a difference (P < 0.05) between the two groups. CV, coefficient of variation; IOI, interovulatory interval; PGFM, PGF2z metabolite.

The concentration of PGFM in daily samples depends on whether a sample is taken during the interval between pulses or at a certain portion of a pulse. As a consequence, daily PGFM concentration can be expected to be quite variable. However, the likelihood of finding significant differences in daily samples is bolstered by greater concentration at pulse nadirs as well as at the peak during luteolysis than before luteolysis [32,36]. Similar to the present results, sampling of PGFM for previous reports in mares has consistently found an increase in PGFM in association with luteolysis even though samples were taken daily [8,10,11,49]. Daily sampling is also effective in gilts [50] and cows [51] for initial study of PGFM concentration as well as for P4 during luteolysis.

Hypothesis 1 was not supported that daily PGFM concentrations in an IOI increase at the intersection between the end of the rapid P4 increase and the gradual P4 decrease. The hypothesis was tested because post hoc analysis for Days 4–7 of the IOI in a previous report [8] tentatively indicated that PGFM transiently increased to a maximum on the day of the intersection from the P4 increase to the gradual decrease. It was speculated that the PGFM increase at this time could account for the change in P4 concentrations. However, neither an increase in daily PGFM on Days 4–7 of an IOI nor a CV-identified PGFM pulse in hourly samples of 8-h sessions on Days 4–7 were detected in either the IOI or pregnancy. That is, an effect of PGFM on P4 concentration at the beginning of the gradual P4 decrease was not confirmed. Temporality between a PGFM increase and a P4 decrease was not detected until the beginning of luteolysis during an IOI.

The increase in PGFM between Days 11 and 13 and a first decrease in P4 between Days 13 and 14 in the daily samples demonstrated an increase in PGFM in the IOI group before the day of the mean beginning of luteolysis. The temporal relationship between a PGFM increase and a P4 decrease was also demonstrated by the day of the maximal PGFM concentration during the 8-h sessions of hourly sampling. The greatest mean concentration of PGFM one day before the end of luteolysis is consistent with the occurrence of the most prominent pulse on Day 14 or 15 in 75% of the mares after the beginning of luteolysis. In a previous report, the first PGFM pulse after the end of luteolysis was similar in prominence to a pulse during mid-luteolysis except that about 17% during postluteolysis were higher (outliers) than a pulse during luteolysis [32].

The results in the IOI group on the temporal association between a PGFM increase and the beginning of luteolysis based on daily samples are consistent with previous studies using hourly samples for characterizing the hour of transition into luteolysis in mares [33,34,36,37]. Relatively small pulses of PGFM occur sporadically in mares during preluteolysis (before transition), and a small pulse occurs at transition [34,52]. The smaller increase in PGFM on days –1 to 0B (day 0B = beginning of luteolysis) than on days 0B–1 in the present study are consistent with the reported small PGFM pulse at the beginning of luteolysis. Oxytocin increases and decreases concomitantly with the small PGFM pulse at transition into luteolysis but not with pulses before luteolysis and may account for the initiation of luteolysis during a small PGFM pulse [34]. In this regard, circulating concentrations of oxytocin tend to increase during the ascending portion of a PGFM pulse during luteolysis [35], and pulses of PGFM are induced by oxytocin treatment [53]. Oxytocin may participate in a positive feedback loop with PGF2 α release in mares as in ruminants [54].

In cattle, the last PGFM pulse of preluteolysis occurs hours before transition into luteolysis (eg, 4 h), and the next pulse occurs well after transition (eg, 9 h); unlike in mares, a PGFM pulse does not occur at the hour of transition into luteolysis [34]. In each of the two species, estradiol increases during a PGFM pulse with a plateau between pulses; LH increases during the descending portion of the

PGFM pulse in cattle but not in mares [55]. The two species also differ in the P4/PGFM relationships within a PGFM pulse during luteolysis. In mares, P4 gradually decreases linearly before, during, and after a PGFM pulse [32,36,55]. In heifers, P4 decreases during the ascending portion of the PGFM pulse and increases during the descending portion [56–58]. Each species has an effective luteolytic mechanism despite the profound differences between species in the P4/PGFM relationship at the beginning of luteolysis and in the hormonal relationships within a PGFM pulse.

This is apparently the first comparison between IOI and the corresponding days of pregnancy for P4 and PGFM concentrations in mares. Similar studies have been done in cattle (heifers [38]; cows [39]). A difficulty in such studies is that the time when luteolysis would have occurred in a pregnant group is unknown, and a direct comparison between the time of luteolysis in the IOI and the time of prevention of luteolysis in pregnant mares is not feasible. This was considered in the present study by comparing PGFM end points between IOI and pregnancy groups for designated ranges of days without regard when luteolysis did or would have occurred. Results for the mean and maximum concentration of PGFM averaged for the nine hourly samples during the 8-h sessions were similar to the results for a single sample on each day. For both approaches, concentrations for Days 13–15 were greater in the IOI than in pregnancy with no differences between groups for any other day.

During the IOI, PGF2 α is released from the uterus [1–3] and stimulates luteolysis on Days 13–15. The presence of the embryo in the uterus suppresses luteolysis and allows the maintenance of pregnancy [59]. The similarity between the IOI and pregnancy in the minimal concentration of PGFM during each of the 8-h sessions on Days 4–7, 9–11, and 13–16 also occurs in heifers on Days 16–18 (days of luteolysis) [38]. That is, in both species the released PGF2 α is in maximal concentration during luteolysis but at baseline (minimal concentration) on other days during the IOI and on all days during early pregnancy.

The mean increase in PGFM during pregnancy on Days 12–15 was much less than in the IOI group but brings into question whether there was an effect of PGFM on P4 during pregnancy. The decreases in P4 between the day of the maximal PGFM concentration on Days 12–15 and the following day tends to indicate that PGFM had a slight transient negative effect on P4 during pregnancy. This observation is considered tentative and will require confirmation. An increase in PGFM during pregnancy also occurs in heifers on the days corresponding to the days of luteolysis (Days 16–18) [38]. In both species, the PGFM concentrations during pregnancy are considerably less than during luteolysis and the maximum is reached about one day later than for luteolysis. The mechanism underlying the small and delayed increase in PGFM during pregnancy at a time corresponding to luteolysis is not known. In pregnant heifers, concentrations of P4 based on inspection of a published graph [38] also appear to begin to decrease on the day (Day 19) of maximum PGFM. Further study in each species with more frequent sampling will be needed to support these tentative observations.

The number of PGFM pulses in mares during luteolysis (0.7 pulses/8 h) is consistent with a previous report for mares [49]. No significant difference in number of CV-identified PGFM pulses between IOI and early pregnancy agrees with a similar study in ewes [60] and heifers [38]. Based on the same system for number of CV-identified pulses/8 h session, the number was apparently less in mares (0.7 pulses/session) than reported for heifers (1.5 pulses/session). The half-life of PGF in mares is three times longer than in cattle [25] and may at least partly involve fewer pulses in mares than in cattle. The method used to identify pulses in the present study seemed efficient in several previous studies in mares [32,36]

and heifers [38,43].

The amplitude of PGFM pulses on Day 4 of pregnancy was low (e.g., 7.4 ± 0.9 pg/mL) compared to the amplitude of the most prominent pulse during luteolysis (91.1 ± 32.8 pg/mL). The greater number of PGFM pulses on Day 4 of pregnancy than in the IOI was from an ad hoc analysis and therefore tentative. The equine embryo in the oviduct secretes prostaglandin E2 [61] and small amounts of PGF2 α [62] on Day 4–5 for embryo transport in the oviduct, and the oviduct muscle secretes PGF2 α [63]. The increase in number of pulses on Day 4 of pregnancy could be related to the increase in PGF2 α in the oviduct assuming that the PGF2 α would be detectable in the systemic blood. This seems unlikely, but further study would be required. It is also unlikely that the greater number of PGFM pulses represented inflammation or residue from the insemination. It has been reported that by 48 h after insemination, remnants of spermatozoa were gone, corynebacteria were no longer cultured, number of neutrophils were no longer increased, and clinical signs of inflammation were no longer detected [64].

In mares of the present study as in heifers of a reported study [38], concentrations of PGFM during a CV-identified pulse were greater during luteolysis than during the corresponding days of pregnancy (mares, Days 13–16; heifers, Days 16–18). In both species, the differences between the IOI vs pregnancy occurred for all aspects of the PGFM pulses (nadirs, amplitude, peak).

Hypothesis 2 was supported that pregnant mares have low amplitude PGFM pulses during the days of the high amplitude pulses at luteolysis in the IOI. The difference between IOI and pregnancy during these days occurred for the nadirs and peak. In this regard, the low values of nadirs, amplitude, and peak in pregnancy occurred not only during the days corresponding to luteolysis (Days 13–16) but also for the other day-sets (Days 4–7 and 9–11). This was shown by no differences among the three day-sets in pregnant mares for either the tabulated data for all pulses and for the graphical display for the 2 d before the peak to 2 d after the peak for all pulses and for only the most prominent pulse per day-set. The consistency in low amplitude PGFM pulses throughout early pregnancy despite the increase in PGFM in daily samples on Days 13–16 seems to indicate that the daily increase was not a consequence of increased pulsatility. Further exploration of the differences in the PGFM increase in the IOI vs pregnancy on Days 13–16 may provide insight on the metabolic pathways in PGF2 α production including auto-amplification of PGF2 α [65].

4.1. Conclusions

Concentrations of P4 increased between Days 0 and 6 and decreased gradually until Day 13 (beginning of luteolysis in the IOI) in both the IOI and pregnancy with no differences between groups. A previously reported increase in PGFM at the beginning of the gradual P4 decrease (Day 6) was not confirmed. An increase in PGFM in the IOI group occurred one day before the beginning of luteolysis. A novel small but significant increase in daily PGFM in the pregnant group occurred beginning on Day 12 and reached maximum on Day 15 or a day later than the increase during luteolysis of the IOI. The daily number of CV-identified pulses did not differ between the IOI and corresponding days of pregnancy. The amplitude and peak of PGFM pulses increased considerably on Days 13–16 during luteolysis in the IOI but no differences in pulse characteristics were found throughout the corresponding days of pregnancy.

CRedit authorship contribution statement

T. Castro: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Project administration, original draft,

reviewed and edited the manuscript. **J.C. Jacob:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, reviewed and edited the manuscript. **G. Stefani:** Investigation. **R.R. Domingues:** Reviewed, Formal analysis. **O.J. Ginther:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, reviewed and edited the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank the Department of Reproduction and Animal Evaluation (DRAA) of the Federal Rural University of Rio de Janeiro for providing mares and Dr. William Thatcher of the University of Florida for PGFM antibodies. Research supported by Coordination of Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) and Eutheria Foundation, Wisconsin, USA. Project E1–TC–18.

References

- [1] McDowell K, Sharp D. Maternal recognition of pregnancy. In: Mc Kinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. Equine reproduction. second ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011. p. 2200–10.
- [2] Stout TAE. Prostaglandins. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. Equine reproduction. second ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011. p. 1642–7.
- [3] Ginther OJ. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. Theriogenology 2009;72:591–8.
- [4] Sharp DC, Black DL. Changes in peripheral plasma progesterone throughout the oestrous cycle of the pony mare. J Reprod Fertil 1973;33:535–8.
- [5] Stabenfeldt GH, Hughes JP, Evans JW. Ovarian activity during the estrous cycle of the mare. Endocrinology 1972;90:1379–84.
- [6] Whitmore HL, Wentworth BC, Ginther OJ. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. Am J Vet Res 1973;34:631–6.
- [7] Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. Anim Reprod Sci 2006;95:144–50.
- [8] Ginther OJ, Castro T, Baldrighi JM, Wolf CA, Santos VG. Defective secretion of prostaglandin F2 α during development of idiopathic persistent corpus luteum in mares. Domest Anim Endocrinol 2016;55:60–5.
- [9] Ginther OJ, Utt MD, Beg MA. Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone concentrations in mares. Anim Reprod Sci 2007;100:197–203.
- [10] Ginther OJ, Baldrighi JM, Castro T, Wolf CA, Santos VG. Concentrations of progesterone, a metabolite of PGF2 alpha, prolactin, and luteinizing hormone during development of idiopathic persistent corpus luteum in mares. Domest Anim Endocrinol 2016;55:114–22.
- [11] Santos VG, Bettencourt EM, Ginther OJ. Hormonal, luteal, and follicular changes during initiation of persistent corpus luteum in mares. Theriogenology 2015;83:757–65.
- [12] Vanderwall DK, Betschart RW, Squires EL. Effect of PGF2alpha and 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. Theriogenology 2000;53:1263–71.
- [13] Bergfelt DR, Ginther OJ. Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. J Equine Vet Sci 1996;16:66–72.
- [14] Ferreira JC, Boakari YL, Rocha NS, Ignacio FS, da Costa GB, de Meira C. Luteal vascularity and embryo dynamics in mares during early gestation: effect of age and endometrial degeneration. Reprod Domest Anim 2019;54:571–9.
- [15] Willmann C, Schuler G, Hoffmann B, Parvizi N, Aurich C. Effects of age and altrenogest treatment on conceptus development and secretion of LH, progesterone and eCG in early-pregnant mares. Theriogenology 2011;75:421–8.
- [16] Squires EL, Wentworth BC, Ginther OJ. Progesterone concentration in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. J Anim Sci 1974;39:759–67.
- [17] Squires EL, Garcia MC, Ginther OJ. Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. J Anim Sci 1974;38:823–30.
- [18] Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. Reproduction 2001;121:513–27.
- [19] Allen WR, Wilsher S. A review of implantation and early placentation in the mare. Placenta 2009;30:1005–15.
- [20] Stout TAE. Embryo-maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. Theriogenology 2016;86:349–54.
- [21] Ginther OJ, First NL. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. Am J Vet Res 1971;32:1687–91.
- [22] Stabenfeldt GH, Hughes JP, Wheat JD, Evans JW, Kennedy PC, Cupps PT. The role of the uterus in ovarian control in the mare. J Reprod Fertil 1974;37:343–51.
- [23] Douglas RH, Ginther OJ. Effect of prostaglandin-F2 α on length of diestrus in mares. Prostaglandins 1972;2:265–8.
- [24] Douglas RH, Ginther OJ. Concentration of prostaglandins F in uterine venous

- plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy. *Prostaglandins* 1976;11:251–60.
- [25] Shrestha HK, Beg MA, Burnette RR, Ginther OJ. Plasma clearance and half-life of prostaglandin F₂alpha: a comparison between mares and heifers. *Biol Reprod* 2012;87(18):1–6.
- [26] Neely DP, Kindahl H, Stabenfeldt GH, Edqvist LE, Hughes JP. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *J Reprod Fertil Suppl* 1979:181–9.
- [27] Tsumagari S, Higashino T, Takagi K, Ohba S, Satoh S, Takeishi M. Changes of plasma-concentrations of steroid-hormones, prostaglandin F₂-alpha-metabolite and pregnant mare serum gonadotropin during pregnancy in thoroughbred mares. *J Vet Med Sci* 1991;53:797–801.
- [28] Haluska GJ, Currie WB. Variation in plasma concentrations of oestradiol-17 beta and their relationship to those of progesterone, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂ alpha and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. *J Reprod Fertil* 1988;84:635–46.
- [29] Sharp DC, Zavy MT, Vernon MW, Bazer FW, Thatcher WW, Berglund LA. The role of prostaglandins in the maternal recognition of pregnancy in mares. *Anim Reprod Sci* 1984;7:269–82.
- [30] Stout TA, Allen WR. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction* 2002;123:261–8.
- [31] Ginther OJ. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1998;44:73–104.
- [32] Ginther OJ, Rodrigues BL, Ferreira JC, Araujo RR, Beg MA. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:684–93.
- [33] Ginther OJ, Beg MA. Hormone concentration changes temporally associated with the hour of transition from preluteolysis to luteolysis in mares. *Anim Reprod Sci* 2011;129:67–72.
- [34] Ginther OJ, Beg MA. The hour of transition into luteolysis in horses and cattle: a species comparison. *Theriogenology* 2012;77:1731–40.
- [35] Ginther OJ, Beg MA. Concentrations of circulating hormones normalized to pulses of a prostaglandin F₂alpha metabolite during spontaneous luteolysis in mares. *Theriogenology* 2009;72:1111–9.
- [36] Ginther OJ, Hannan MA, Beg MA. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF₂z, progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domest Anim Endocrinol* 2011;41:174–84.
- [37] Ginther OJ, Beg MA. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biol Reprod* 2012;86:1–12.
- [38] Pinaffi FLV, Araujo ER, Ginther OJ. Concentrations of a PGF₂z metabolite during pregnancy on the days that luteolysis occurs in nonbred heifers. *Domest Anim Endocrinol* 2018;62:76–82.
- [39] Mezera MA, Hamm CS, Gamarra CA, Gennari RS, Prata AB, Sartori R, et al. Profiles of prostaglandin F₂z metabolite in dairy cattle during luteal regression and pregnancy: implications for corpus luteum maintenance. *Biol Reprod* 2019;101:76–90.
- [40] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1986.
- [41] Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:445–54.
- [42] Ginther OJ, Pierson RA. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology* 1984;21:505–16.
- [43] Ginther OJ, Silva LA, Araujo RR, Beg MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 2007;76:506–13.
- [44] Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction* 2005;130:379–88.
- [45] Gastal EL, Bergfelt DR, Nogueira GP, Gastal MO, Ginther OJ. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *Biol Reprod* 1999;61:1492–8.
- [46] Bergfelt DR, Gastal EL, Ginther OJ. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biol Reprod* 2001;65:426–32.
- [47] Kelly CM, Hoyer PB, Wise ME. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. *J Reprod Fertil* 1988;84:593–600.
- [48] Stewart F, Allen WR. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:431–40.
- [49] Santos VG, Beg MA, Bettencourt EM, Ginther OJ. Role of PGF₂z in luteolysis based on inhibition of PGF₂z synthesis in the mare. *Theriogenology* 2013;80:812–20.
- [50] Guthrie HD, Rexroad Jr CE. Endometrial prostaglandin f release in vitro and plasma 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂z in pigs with luteolysis blocked by pregnancy, estradiol benzoate or human chorionic gonadotropin. *J Anim Sci* 1981;52:330–9.
- [51] Parkinson TJ, Lamming GE. Interrelationships between progesterone, 13,14-dihydro-15-keto PGF₂ alpha (PGFM) and LH in cyclic and early pregnant cows. *J Reprod Fertil* 1990;90:221–33.
- [52] Ginther OJ, Pinaffi FL, Silva LA, Beg MA. Temporal relationships of a pulse of prolactin (PRL) to a pulse of a metabolite of PGF₂z in mares. *Theriogenology* 2012;77:99–107.
- [53] Santos VG, Castro T, Bettencourt EM, Ginther OJ. Oxytocin induction of pulses of a prostaglandin metabolite and luteolysis in mares. *Theriogenology* 2015;83:730–8.
- [54] Utt MD, Acosta TJ, Willbank MC, Ginther OJ. Acute effects of prostaglandin F₂z on systemic oxytocin and progesterone concentrations during the mid- or late-luteal phase in mares. *Anim Reprod Sci* 2007;97:63–73.
- [55] Ginther OJ, Rodriguez MB, Beg MA. Concentrations of circulating hormones during the interval between pulses of a PGF₂z metabolite in mares and heifers. *Anim Reprod Sci* 2011;128:22–8.
- [56] Ginther OJ, Shrestha HK, Fuenzalida MJ, Shahiduzzaman AKM, Beg MA. Characteristics of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂alpha before, during, and after spontaneous luteolysis and temporal intrapulse relationships with progesterone concentrations in cattle. *Biol Reprod* 2010;82:1049–56.
- [57] Ginther OJ, Shrestha HK, Fuenzalida MJ, Shahiduzzaman AK, Hannan MA, Beg MA. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F₂z and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology* 2010;74:1179–86.
- [58] Ginther OJ, Shrestha HK, Beg MA. Circulating hormone concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F₂z during preluteolysis and early luteolysis in heifers. *Anim Reprod Sci* 2010;122:253–8.
- [59] Ealy AD, Eroh ML, Sharp DC. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Anim Reprod Sci* 2010;117:99–105.
- [60] Zarco L, Stabenfeldt GH, Basu S, Bradford GE, Kindahl H. Modification of prostaglandin F₂ alpha synthesis and release in the Ewe during the initial establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1988;83:527–36.
- [61] Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E₂ hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol Reprod* 1991;45:544–6.
- [62] Weber J, Woods G. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. *Equine Vet J* 1993;25:36–8.
- [63] Troedsson MH, Liu IK, Ing M, Pascoe J. Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F₂z, and prostaglandin E₂ on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. *Biol Reprod* 1995;52:475–88.
- [64] Katita T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol Reprod* 1995;1:515–7.
- [65] Kozai K, Tokuyama S, Szostek AZ, Toishi Y, Tsunoda N, Taya K, Sakatani M, Takahashi M, Nambo Y, Skarzynski DJ, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. Evidence for a PGF(2 alpha) auto-amplification system in the endometrium in mares. *Reproduction* 2016;151:517–26.



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



Local embryo-mediated changes in endometrial gene expression during embryo mobility in mares



T. Castro ^{a, b, c}, J.C. Jacob ^a, R.R. Domingues ^{b, c}, O.J. Ginther ^{b, c, *}

^a Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

^b Eutheria Foundation, Cross Plains, WI, 53528, USA

^c Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, 53706, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 November 2021
Received in revised form 26 January 2022
Accepted 27 January 2022
Available online 29 January 2022

Keywords:
Cytobrush
Gene expression
Mares
Pregnancy
Prostaglandins

ABSTRACT

Prostaglandin E2 (PGE2) and prostaglandin F2 α (PGF2 α) are involved in equine embryo mobility throughout the uterus on Days 11–15 (ovulation = Day 0). On a day (Day 12) of maximal embryo mobility in pregnant mares (n = 13) and before luteolysis in nonbred mares (n = 10), gene expressions were compared between the uterine horns that did and did not contain the mobile embryo and between pregnant and nonbred mares. A cytobrush was used to collect an endometrial sample from the middle of each uterine horn. In nonbred mares, there was no difference for any of the considered gene expressions between the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL or for side (left vs right). For endometrial estrogen receptors, ESR1 was lower (P < 0.03) and ESR2 was greater (P < 0.04) for pregnant than nonbred mares. The mRNA abundance for PGE2 synthase (PTGES) was greater (P < 0.05) in the horn with (1.40 \pm 0.10) than without (0.89 \pm 0.10) the embryo and was greater (P < 0.05) in the horn with the embryo than in the combined horns of nonbred mares (1.06 \pm 0.10). The hypothesis that the embryo locally upregulates PGE2 and PGF2 α synthesis in the endometrium adjacent to the embryo in the pregnant group but not in the uterine horns of the nonbred group, was partially supported; only PGE2 synthase (PTGES) was locally upregulated in the endometrium adjacent to the mobile embryo.

© 2022 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Progesterone (P4) concentration in mares increases until Day 7 after ovulation (Day 0 = ovulation) and gradually decreases similarly during nonpregnancy and pregnancy until the beginning of luteolysis during nonpregnancy on Day 13 [1]. Around Day 13 in nonpregnancy, prostaglandin F2 α (PGF2 α) is released from the endometrium and induces a decrease in P4 concentrations and luteolysis [2]. The PGF2 α reaches the CL via a systemic route in mares [3] contrasting with a unilateral uteroluteal route in several other species including cattle. Synthesis and secretion of PGF2 α and luteolysis are blocked in pregnant mares [1] which contributes to the maintenance of P4 concentrations that is vital for pregnancy maintenance [4]. The interaction among different steroid hormones and prostaglandins and their endometrial receptors involves complex pathways and plays a role in regulation of estrous cycle and early pregnancy. It is well established that the presence of an

embryo influences endometrial activity [5], and the endometrial activity influences ovarian regulation and function [6].

Concentrations of P4 and estradiol are the main regulators of morphologic characteristics and functional changes in the equine endometrium [7]. In mares, the dynamics of uterine estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PGR) have been described [8,9]. The endometrial estrogen receptors are ESR α (ESR1) and ESR β (ESR2) [10]. The ESR1 plays a major role in the uterotrophic effects of estrogen [11], and ESR2 function in the endometrium is not well understood [12]. Also, the ESR2 has considerable sequence homology with ESR1 [13]. For prostaglandin synthesis, oxytocin binds to its endometrial receptors (OXTR) which stimulate phospholipase A2 (PLA2) activation that mobilizes arachidonic acid [14]. Arachidonic acid is converted into prostaglandin H2 (PGH2) by prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2). The PTGS1 and PTGS2 are also known as COX1 and COX2, respectively. The PGH2 is

* Corresponding author. Eutheria Foundation, Cross Plains, WI, 53528, USA.
E-mail address: oj.ginther@wisc.edu (O.J. Ginther).

converted into either prostaglandin E2 (PGE2) or PGF2 α by PGE synthase (PTGES) and PGF synthase (PTGFS), respectively [15]. Transport of PGF across the plasma membrane in endometrial cells is facilitated by a PGF transporter (SLCO2A1) [16]. The PGE2 and PGF2 α are converted into their metabolites by the enzyme 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD) [15].

The fertilized equine embryo passes from oviduct to uterine horn on about Day 6 [17]. The intrauterine equine embryo is first detectable by conventional ultrasonic imaging on Days 9 or 10 [18] and thereafter travels throughout the uterine lumen [19]. The embryo achieves maximum mobility on Days 11–12 [20] in temporal association with maximal uterine contractility [21]. Embryo mobility ceases at fixation in a caudal uterine horn on Days 15 in ponies and 16 in horses [22]. Either *iu* or *iv* treatment with PGE2 *in vivo* [23] and PGF2 α *in vitro* [24] stimulate myometrial contractions and PGE2 and PGF2 α *im* during diestrus increase electrical activity of myometrium [25]. Embryo mobility decreases when uterine contractions are inhibited with clenbuterol [26] and nonsteroidal anti-inflammatory drugs [27]. *In vitro* PGE2 produced by the equine embryo binds to endometrial tissue of nonpregnant mares on Days 11–15 [28]. Both PGE2 and PGF2 α are produced by the embryo and endometrium [29,30]. However, uterine flushings on Days 14 and 16 in pregnant mares contain PGE2 but not PGF2 α [27], consistent with PGE2 being the main stimulator of embryo mobility.

Cornual ligation to restrict embryo mobility result in luteolysis [31] and increases uterine tone and contractility on the side with the embryo but not on the side that is not exposed to the embryo [18]. Uterine body contractions decrease 55 min after the embryo has left the uterine body [32]. Endometrial vascularity increases in pregnant mares as early as Days 7–8 [33]. Endometrial vascularity score is greater in the uterine horn that contains the embryo than in the opposite horn on Days 12–15 and increases within 7 min after the embryo enters a uterine horn [34]. These studies demonstrated a local intrauterine effect of the mobile embryo on preventing luteolysis and altering uterine characteristics including the local stimulation of uterine contractions and endometrial blood flow. Nevertheless, a local effect of the equine embryo on endometrial gene expression *in vivo* apparently has not been reported.

The present study was done during the maximal embryo mobility (Day 12) to simultaneously compare molecular changes in the endometrium between the uterine horn that does and does not contain the mobile embryo. The hypothesis was that the embryo locally upregulates PGE2 and PGF2 α synthesis in the endometrium adjacent to the embryo in pregnant group but not in the uterine horns of the nonbred group.

2. Material and methods

2.1. Mares

Nonlactating Mangalarga Marchador mares ($n = 23$) aged 6 to 15 y and weighing 388–462 kg were used from January to March in southeastern Brazil (latitude, 23°; longitude, 44°). The mares were kept under natural light on pasture and supplemented with grass hay and trace-mineralized salt with free access to water. All mares remained healthy and in good body condition throughout the study. Abnormalities of the reproductive tract including intrauterine fluid during diestrus (indicator of endometritis [35]) were not detected by transrectal ultrasonic imaging. Mares that had a second ovulation during estrus or early diestrus were not used because mares with a second ovulation would have higher circulating P4 concentration [6], and a second ovulation on the side opposite to the first ovulation would have precluded comparison of CL to non CL sides. The mares were handled in accordance with the

Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA protocol number 0022-10-2018-CEUA).

2.2. Experimental design

Mares in diestrus with a mature CL were treated *im* with a luteolytic dose (5 mg) of PGF2 α (dinoprost tromethamine, Lutalyse, Zoetis, SP, Brazil), and thereafter the ovaries and uterus were scanned daily until detection of a ≥ 35 mm preovulatory follicle and an endometrium echotexture characteristic of estrus [35]. Then, all mares were induced to ovulate by *iv* administration of 1000 IU of hCG (Vetecor, Hertape Calier®). Artificial insemination was done 24 h after induction of ovulation. Mares were randomized into a nonbred group ($n = 10$) and bred mares ($n = 17$) that became pregnant to form a pregnancy group ($n = 13$). Fresh semen (20–30 mL with a total of 500×10^6 cells with progressively motile spermatozoa) from two fertile stallions was diluted 1:1 with a semen extender (Botusemen®; Botupharma, Brazil). Ovulation was determined daily, and the day of ovulation was designated as Day 0 (uppercase "D"). Pregnancy diagnosis was done by ultrasonic imaging on Day 12.

For collection of cytobrush endometrial samples, the uterus was partitioned into three imaginary segments of similar length for each uterine horn and the uterine body, as described [36]. Ultrasonic imaging and local endometrial cytobrush samples were collected for evaluation of mRNA expression of genes associated with the time of maximal mobility of the embryo.

Transrectal ultrasonic imaging was used to determine the day of ovulation, side of CL (right or left ovary), percentage of cross-sectional area of CL with blood flow signals, and extent of uterine edema. In addition, ultrasonic imaging was needed for diagnosis of pregnancy, monitoring the intrauterine location of the embryo, and for guiding of the cytobrush. Ovulations were determined once each day between 8 and 9 a.m. The ultrasound machine (Mindray Z5-Vet; Mindray North America, Mahwah, NJ, USA) was equipped with a linear-array 7.5-MHz transrectal transducer.

2.3. Collection of endometrial cytobrush samples

In the pregnancy group on Day 12, transrectal ultrasonic imaging was done every 10 min until the embryonic vesicle had moved from the uterine body to the middle segment of one of the uterine horns. Side (left/right) of embryo and side of CL were recorded. The cytobrush (PROVAR® - São Paulo, Brazil) was inserted intravaginally and gently introduced into the uterine horn with the embryo guided by ultrasonic imaging. Endometrial samples were collected in the horn approximately 5 mm caudal to the embryo at first examination (Fig. 1). Immediately thereafter, an endometrial cytobrush sample was collected in the middle segment from the opposite uterine horn that still did not contain the embryo. A cytobrush sample was taken by rotating the brush for approximately 20 s for retrieval of endometrial cells [37,38]. After the sampling, the embryo was located to confirm it was still in the same horn. In the nonbred group, the endometrial cytobrush collection was done in the middle of the left and right horns, and side of CL was recorded. Collection of endometrial cellular material from the cytobrush was done immediately by placing it into a 4.5 mL cryogenic storage tube containing 1.5 mL of RNAlater™ solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The samples were stored at -80 °C until RNA extraction. Additionally, on the day of the cytobrush collection (Day 12), CL blood flow, CL diameter, and CL echogenicity were evaluated as described [39] to confirm that luteolysis had not begun.

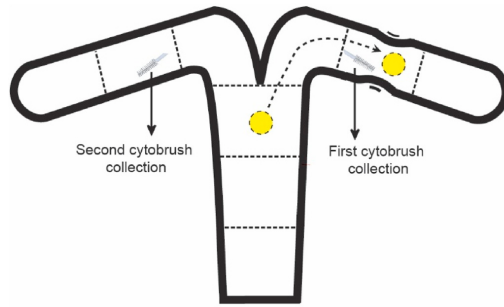


Fig. 1. Experimental design for cytobrush-sample collection in pregnancy group. Transrectal ultrasonic imaging was done every 10 min until the embryonic vesicle (yellow circle) had moved from the uterine body to the middle segment of one of the uterine horns. When the embryo was located in the middle segment of one of the uterine horns, a cytological brush was inserted intravaginally and gently introduced into the uterine horn with the embryo guided by the ultrasonic images. Endometrial samples were collected in the horn approximately 5 mm caudal to the embryo at first examination. Immediately thereafter, an endometrial cytobrush sample was collected in the middle segment from the opposite uterine horn that did not contain the embryo. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2.4. RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative RT-PCR

The RNA from endometrial samples was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as describe by the manufacturer. The endometrial RNA of the samples was quantified by spectrometry with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA).

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer using 1 µg of total RNA. The cDNA was used directly for quantitative real-time

PCR (qRT-PCR). The qRT-PCR reactions were carried out on a CFX Connect Real-Time PCR system (Bio-Rad Life Science, Hercules, CA, USA) using a master mix that contained a total volume of 10.5 µL per tube consisting of 6.25 µL of SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Life Science, Hercules, CA, USA), 3.25 µL of nuclease-free water, and 0.5 µL of forward and reverse primers (10 µM). Two µL of cDNA at a 1:4 dilution was added to the master mix for a total reaction volume of 12.5 µL. All samples were evaluated in duplicate. The reactions were initiated with preincubation at 95 °C for 3 min followed by 42 cycles of denaturation (95 °C for 10 s) and annealing and extension (60 °C for 30 s).

Primers (Table 1) were synthesized by Integrated DNA Technologies Inc. as previously reported [12,40–42]. Efficiencies of qRT-PCR for amplification of targeted genes were determined in our laboratory and ranged from 95% to 106%. The amplification data obtained from the qRT-PCR as the cycle threshold (Ct) was used to calculate the mRNA relative abundance of each sample by the 2^{-ΔΔCt} method [43]. The GAPDH was used as the housekeeping gene [40].

2.5. Statistics

Data that were not normally distributed on the basis of a Shapiro–Wilk test were resolved by transformation into natural logarithms, square root, or ranks. Data processing used the statistical analysis system (SAS) proc mixed with a repeated statement to minimize autocorrelation of sequential measurements (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary NC, USA). Relative abundance of mRNA was analyzed by one-way or two-way ANOVA. When an interaction was significant or approached significance, Tukey’s honestly significant difference test was used for comparisons between groups. Student’s paired t-tests were also used on a preliminary basis for comparisons of special interest. A probability of P ≤ 0.05 indicated a difference was significant, and a probability between P > 0.05 and P ≤ 0.10 indicated that significance was approached. Differences that approached significance were included on a tentative or preliminary basis for potential consideration in future studies. Data are presented as the mean ± standard error of the mean unless otherwise indicated.

Table 1
Primer sequences for genes that were analyzed using qRT-PCR.

Gene symbol	Primer sequence	GenBanker ID	Amplicon length
PGR	F: GTCAGTGGACAGATGCTGTA R: CGCCTTGATGAGCTCTCTAA	XM_001498494.4	255
ESR1	F: TCCATGATCAGGTCCACCTTCT R: GGTGTCTGTCATCTTGCCA	NM_001081772.1	341
ESR2	F: TCAGCCTGTTGACCAAGTG R: CCTTGAAGTCTGTCAGGA	XM_001915519.2	194
OXTR	F: CATCTGGCTGGCCTTCATCGTGTG R: GGTAGCCGGAGGAGCAGCAGAGGA	XM_005600468.1	218
PTGS1	F: GAGTACGTGCAGCAGCTGAG R: GTGCCAGTGGTAGAGGTGGT	XM_001163976.1	126
PTGS2	F: TATCCGCCACAGTCAAAGACA R: TGTGTGTTCGCCAGCCAAAT	NM_001081775	148
PTGFS	F: AAGCCAGGCTCAAGTACAA R: AGCACCGTAGGCACTAGGA	NM_001081895	120
PTGES	F: CACGCTGTGGTCAATCAAGA R: GGTCTGCCGGTGAACCTG	NM_001081935.1	128
SLCO2A1	F: CGTCTTCCCTTCITTTTCTTTT R: CGCAGCGGGAGGTTTACG	XM_005601058.1	315
PGFR	F: CGTGTGCTTGTGCTGT R: ATGGCAITGCACAAGAATGA	NM_001081806	192
PTGER2	F: CCTCCAAGCCCTTAGGTTTC R: TATCCACAAGGCCAGCTAC	NM_001127352.1	192
HPGD	F: GTTGACACAGGCGCTGTTA R: CATCGATGGTCCAAAATTC	NM_001081786.1	240
GAPDH	F: ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA R: GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG	NM_001163856	341

Primer sequences were based on previously published primer sequences [12,40–42].

3. Results

Each mare in the nonbred and pregnancy groups on Day 12 had CL blood flow $\geq 60\%$ of CL cross-sectional area and CL area ($\geq 5.8 \text{ cm}^2$) consistent with a mature functional CL [39]. Endometrial gene expressions in the nonbred group are shown (Fig. 2). In the nonbred group, there was no difference for any of the considered gene expressions between the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL. The $\text{PGF2}\alpha$ receptor (PGFR) approached being greater in the uterine horn contralateral to the CL (1.15 ± 0.15) than in the uterine horn ipsilateral to the CL (0.60 ± 0.12). There was no interaction for any of the gene expressions between side of the CL (ipsilateral vs contralateral) and side of the horn (left vs right). An approach ($P < 0.08$) for greater gene expression of SLCO2A1 for the right horn than for the left horn was observed (not shown).

In the pregnancy group, endometrial gene expressions in the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL are shown (Fig. 3). Endometrial gene expression for estrogen receptor α (ESR1) was greater in the uterine horn contralateral to the CL (1.27 ± 0.07) than in the uterine horn ipsilateral to the CL (0.98 ± 0.05). Endometrial gene expression for ESR2 approached being greater in the uterine horn ipsilateral to the CL (1.56 ± 0.30) than in the uterine horn contralateral to the CL (1.10 ± 0.14); there was no difference in expression for any gene between left and right horns. The interaction for embryo by CL (horn with vs horn without the embryo vs ipsilateral vs contralateral) was not significant for any gene expression. Endometrial gene expressions in the uterine horn with vs without the embryo are shown (Fig. 4). The gene expression for estrogen receptor β (ESR2) approached being greater for the horn with (1.28 ± 0.16) than for the horn without (0.98 ± 0.15) the embryo. Endometrial gene expression for PGE synthase (PTGES) was greater for the horn with (1.43 ± 0.09) than without (0.90 ± 0.11) the embryo.

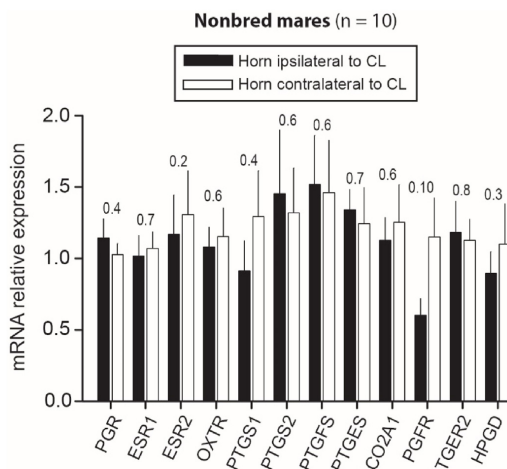


Fig. 2. Mean \pm SEM for mRNA abundance in the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL in the nonbred group. The probability for a difference between horns is shown for each gene (no significance differences). PGR, progesterone receptor; ESR1, estradiol receptor alpha; ESR2, estradiol receptor beta; OXTR, oxytocin receptor; PTGS1, prostaglandin-endoperoxide synthase 1; PTGS2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PTGFS, prostaglandin F2alpha synthase; PTGES, prostaglandin E2 synthase; SLCO2A1 , solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (prostaglandin F transporter); PGFR, prostaglandin F2alpha receptor; PTGER2, prostaglandin E2 receptor; HPGD, hydroxyprostaglandin dehydrogenase.

Endometrial gene expressions among the combined left and right uterine horns in nonbred mares and in a uterine horn with vs without the embryo in the pregnancy group are shown (Fig. 5). Gene expression for ESR1 was greater in the combined horns for nonbred mares (1.30 ± 0.1) than in the horn with (0.95 ± 0.1) and without (0.9 ± 0.1) the embryo in the pregnant group. Gene expression for ESR2 was greater in the horn with (1.51 ± 0.13) and without (1.40 ± 0.11) the embryo in bred mares than in the horns of nonbred mares (1.03 ± 0.11). Differences between horns for the gene expression for prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) approached being greater in the combined horns of nonbred mares (1.49 ± 0.28) than in the horn with (0.74 ± 0.20) and without the embryo (0.76 ± 0.17) in the pregnant group. Gene expression for PTGES was greater in the horn with (1.40 ± 0.10) than without (0.89 ± 0.10) the embryo in bred mares and was greater than in the uterine horns of nonbred mares (1.06 ± 0.10).

4. Discussion

The collection of endometrial samples for evaluation of gene expression has been done mainly by biopsy [44]; however, recent publications have shown that the cytobrush technique is an efficient method for in vivo endometrial sample collection to evaluate gene expression in luminal epithelial cells in cattle [37,38] and horses [44]. This technique is readily done and allows the collection of samples in specific parts of the uterus and close to the mobile equine embryo. To our knowledge, this is the first study that evaluates endometrial gene expression in mares by considering the intercornual location of the mobile embryo. Side of the CL was also considered in pregnant and nonbred mares.

In the nonbred group, endometrial cytobrush sampling on Day 12 preceded the onset of luteolysis in every mare based on CL

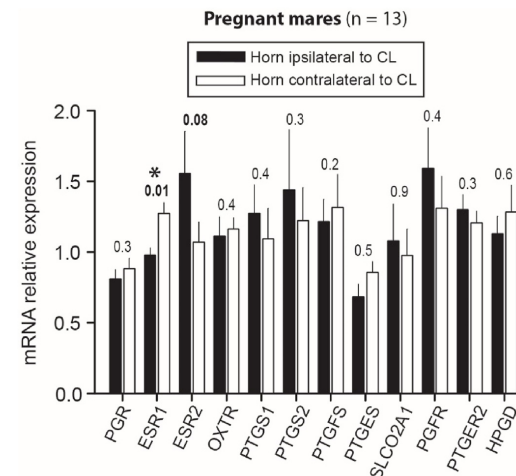


Fig. 3. Mean \pm SEM for mRNA abundance in the uterine horn ipsilateral and contralateral to the CL in the pregnant group. The probability for a difference between groups is shown for each gene. PGR, progesterone receptor; ESR1, estradiol receptor alpha; ESR2, estradiol receptor beta; OXTR, oxytocin receptor; PTGS1, prostaglandin-endoperoxide synthase 1; PTGS2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PTGFS, prostaglandin F2alpha synthase; PTGES, prostaglandin E2 synthase; SLCO2A1 , solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (prostaglandin F transporter); PGFR, prostaglandin F2alpha receptor; PTGER2, prostaglandin E2 receptor; HPGD, hydroxyprostaglandin dehydrogenase. An asterisk (*) indicates a significant difference between the two uterine horns.

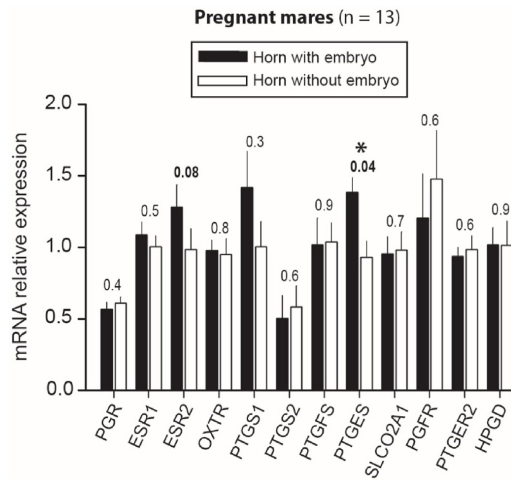


Fig. 4. Mean \pm SEM for mRNA abundance in the uterine horn with and without the embryo in the pregnancy group. The probability for a difference among horns is shown for each gene. PGR, progesterone receptor; ESR1, estradiol receptor alpha; ESR2, estradiol receptor beta; OXTR, oxytocin receptor; PTGS1, prostaglandin-endoperoxide synthase 1; PTGS2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PTGFS, prostaglandin F2 α synthase; PTGES, prostaglandin E2 synthase; SLCO2A1, solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (prostaglandin F transporter); PGFR, prostaglandin F2 α receptor; PTGER2, prostaglandin E2 receptor; HPGD, hydroxyprostaglandin dehydrogenase. An asterisk (*) indicates a significant difference between the two uterine horns.

diameter and percentage of CL with blood-flow signals that were similar to reported findings for preluteolysis [39]. Progesterone modulates endometrial function [7], and the progesterone receptor (PGR) is expressed differently based on the side of the functional CL in cows [45] and sheep [46]. The absence of differences in gene expression between the horn ipsilateral and contralateral to the CL in the nonbred mares at least a day before the beginning of luteolysis suggest that the side of CL did not have a unilateral affect on endometrial gene expression for receptors and enzymes that have been reported to be involved in preparation for prostaglandin synthesis and luteolysis. These results for nonbred mares are consistent with a reported study in which no unilateral CL affect on endometrial gene expression of PGR and estrogen receptor α (ESR1) was found before luteolysis [47].

The hypothesis that the embryo locally upregulates PGE2 and PGF2 α synthesis in the endometrium adjacent to the embryo, was partially supported. Greater expression of PGE2 synthase (PTGES) occurred in the horn with the embryo than in horn without the embryo in pregnant group and in the uterine horns of the nonbred group. The lack of a similar local difference in PGF2 α synthase (PTGFS) indicated that the embryo locally stimulated endometrial PGE2 production but did not locally stimulate PGF2 α production. In vitro, the embryo releases PGE2 and PGF2 α after Day 10, and PGE2 concentrations in the yolk sac of the embryo is five times greater than for PGF2 α concentrations [27]. An endometrial auto-amplification system in which PGF2 α can stimulate its own production has been proposed in mares [48] and cows [49]. Therefore, production of PGE2 in the endometrium by auto-amplification from the initial production of PGE2 by the embryo should be investigated.

The equine embryo secretes estrogen as early as Day 10 [50], and estrogen has the capability to stimulate PGE2 and PGF2 α

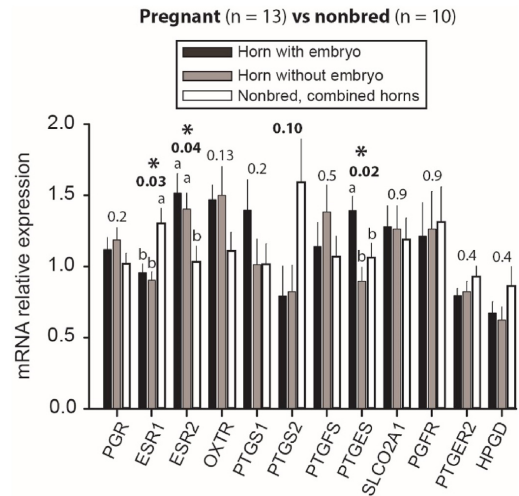


Fig. 5. Mean \pm SEM for mRNA abundance in the uterine horn with the embryo, uterine horn without the embryo, and in the uterine horn of the nonbred group. The probability for differences among horns is shown for each gene. PGR, progesterone receptor; ESR1, estradiol receptor alpha; ESR2, estradiol receptor beta; OXTR, oxytocin receptor; PTGS1, prostaglandin-endoperoxide synthase 1; PTGS2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PTGFS, prostaglandin F2 α synthase; PTGES, prostaglandin E2 synthase; SLCO2A1, solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (prostaglandin F transporter); PGFR, prostaglandin F2 α receptor; PTGER2, prostaglandin E2 receptor; HPGD, hydroxyprostaglandin dehydrogenase. An asterisk (*) indicates a significant difference among the uterine horns. (a,b) Means with a different letter are different ($P < 0.05$).

production by endometrium cells in vitro [51]. The present finding of greater endometrial gene expression of PTGES in the uterine horn with the embryo than without the embryo may represent auto-amplification of estrogen secretion from the embryo. In contrast, PTGFS expression was not unilaterally affected by location of the embryo. A recent study found that the synthesis of PGE2 and PGF2 α by the embryo occur in opposite poles based on location of the embryonic disc, it was speculated that this may account for movement of the embryonic vesicle in a certain direction [52]. More than one factor could be involved in embryo mobility and future study in a single project involving endometrial and embryo cells is needed to differentiate the local role of PGE2 and PGF2 α in uterine contractions and role of estrogen in embryo mobility.

The estrogen and P4 mRNA expressions in the mare endometrium are stimulated by estrogen and downregulated by P4 [53]. Expression of PGR is not different between pregnant and nonbred mares on Day 14 [8,42]; however, PGR is greater in nonbred than pregnant mares on Day 17 [8] and on Day 21 [42]. Our study did not find a difference for PGR gene expression between pregnant and nonbred mares in samples collected on Day 12 which was before luteolysis. Concentrations of P4 from the same breed as used in the present study were not different between pregnant and nonbred mares until the beginning of luteolysis on mean Day 13 [1]. That is, there was no indication of PGR involvement on the day before luteolysis.

The lower gene expression of ESR1 in the pregnancy group than in the nonbred group agree with previous reports that in pregnant mares downregulation of ESR1 occurs on Days 10 [9] and 12 [54]. The ESR1 plays a major role in the uterotrophic effect of estrogen [11], and a decrease of ESR1 have been described as one of the

regulators of the luteal response to pregnancy in mares [5]. In mares, oxytocin (synthesized as the inactive precursor oxytocin-neurophysin I; OTNP1) binds to its receptor to trigger PGF synthesis and secretion from the endometrium [55], and treatment of oxytocin iv has been shown to cause PGF 2α release in nonbred mares [56]. Also, estrogen is associated with luteal regression based on a positive correlation of oxytocin-neurophysin I (OTNP1) and estradiol concentration [41]. Another interpretation for reduced ESR1 expression in pregnant mares is that the large amounts of estrogen synthesized by the embryo leads to down-regulation of ESR1 in early pregnancy as previously suggested [5]. Previous reports in which oxytocin receptors in mares were up-regulated only during luteolysis [41] and estrus [53] are compatible with the present results of no difference in OXTR gene expression between bred and nonpregnant groups on a day that precedes luteolysis. Similarity in endometrial OXTR concentration between pregnant and nonbred mares on Day 12 (before luteolysis) has been reported previously [57].

Lower gene expression for ESR1 in the uterine horn ipsilateral to the CL in pregnant mares has been reported on Day 13 [47]. It was discussed that lower ESR1 gene expression in the horn ipsilateral to the CL could be associated with a unilateral increase in P4 concentration in the horn ipsilateral to the CL and the downregulation of ESR1 gene expression by P4. However, our study found no difference in (1) ESR1 gene expression between the horn ipsilateral and contralateral to the CL in the nonbred group and (2) no difference for PGR in the pregnancy group that could be associated with reduction of ESR1 expression. The greater gene expression for estrogen receptor β (ESR2) in pregnant mares than in nonbred mares, tendency for greater ESR2 gene expression in the horn ipsilateral than contralateral to the CL, and tendency for greater ESR2 gene expression in the horn with than without the embryo may be related to similar indications for mice [58] and heifers [38]. In these species, ESR2 may be a response to modulation of cellular function by inhibition of ESR1 action in the uterus. No differences were found between pregnant vs nonbred mares for ESR2 expression on Days 7, 14, and 21 [42]. In the present study, results on ESR1 and ESR2 were not hypothesized and did not adequately clarify whether there is a relationship between side of embryo or side of CL on endometrial synthesis of ESR1 and ESR2 in mares; future studies are needed.

The tendency for lower PTGS2 gene expression in the pregnant than nonbred group may represent the beginning of down-regulation of PTGS2 expression attributable to the embryo. The PTGS2 mRNA expression in the endometrium is associated with the production of prostaglandin [59], and has been shown to be upregulated during expected time of luteolysis in nonbred mares. In the corresponding days in pregnant mares, a downregulation of PTGS2 is essential for preventing PGF 2α synthesis [40,60,61].

The greater endometrial gene expression for PTGES but not for PTGFS in the uterine horn with an embryo versus in the uterine horns of nonbred mares, indicated that only PTGES was produced locally by the endometrium adjacent to the embryo. Furthermore, reported studies that compared PTGES gene expression in the endometrium of pregnant and nonbred mares either found greater PTGES expression before luteolysis [40] or no difference between groups on Day 15 [60]. However, neither of these studies considered the location of the embryo during collection of the endometrial biopsy sample. The present study emphasizes the importance for embryo location on analyses of gene expression in the endometrium. The nondifference between nonbred and pregnancy groups for genes involved in PGF synthesis, transport, signaling, and metabolism (PTGFS, SLCO2A1, PGFR, HPGD) indicates that the embryo does not locally influence the expression of these genes on the approximate day before the beginning of luteolysis.

4.1. Conclusions

Samples collected by cytobrush in the middle of each uterine horn during embryo mobility in mares indicated a local effect of the embryo on gene expression in the adjacent endometrium. Upregulation of PTGES only in the horn with the embryo and absence of similar results for PTGFS, demonstrated that the mobile embryo upregulated PGE2 synthesis in the endometrium adjacent to the embryo, but did not upregulate PGF 2α synthesis. The difference in endometrial gene expression between the uterine horn with and without the embryo emphasized the importance of location of the mobile embryo in analyses of gene expression in the endometrium.

CRedit authorship contribution statement

T. Castro: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Project administration, Writing – original draft, reviewed and edited the manuscript. **J.C. Jacob:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, reviewed and edited the manuscript. **R.R. Domingues:** Conceptualization, Methodology, reviewed, Formal analysis. **O.J. Ginther:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, reviewed and edited the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank the Department of Reproduction and Animal Evaluation (DRAA) of the Federal Rural University of Rio de Janeiro for providing mares and August Hoppmann for helping with laboratory work. Research supported by Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Brazil and Euthera Foundation, Wisconsin, USA. Project E1–TC–20.

References

- [1] Castro T, Jacob JC, Stefani G, Domingues RR, Ginther OJ. Concentrations of progesterone and a PGF 2α metabolite during the interovulatory interval compared to the corresponding days of pregnancy in mares. *Theriogenology* 2021;165:10–7.
- [2] Santos VG, Bettencourt EM, Ginther OJ. Hormonal, luteal, and follicular changes during initiation of persistent corpus luteum in mares. *Theriogenology* 2015;83:757–65.
- [3] Douglas RH, Ginther OJ. Route of prostaglandin F 2α injection and luteolysis in mares. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1975;148:263–9.
- [4] Stout TAE. Embryo–maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. *Theriogenology* 2016;86:349–54.
- [5] Klein C, Scoggin KE, Ealy AD, Troedsson MH. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 2010;83:102–13.
- [6] Ginther O. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. second ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1992.
- [7] Aurich C. Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci* 2011;124:220–8.
- [8] Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction* 2005;130:241–50.
- [9] McDowell KJ, Adams MH, Adam CY, Simpson KS. Changes in equine endometrial oestrogen receptor alpha and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J Reprod Fertil* 1999;117:135–42.
- [10] Enmark E, Pelto–Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J. Human estrogen receptor beta—gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258–65.
- [11] Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 1993;90:11162–6.
- [12] Rebordão MR, Galvão A, Pinto-Bravo P, Pinheiro J, Gamboa S, Silva E, Mateus L, Ferreira-Dias G. Endometrial prostaglandin synthases, ovarian steroids, and oxytocin receptors in mares with oxytocin-induced luteal maintenance. *Theriogenology* 2017;87:193–204.
- [13] Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O,

- Taketani Y, Muramatsu M. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *J Mol Endocrinol* 1999;22:37–44.
- [14] McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 1999;79:263–323.
- [15] Needleman P, Jakshik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986;55:69–102.
- [16] Schuster VL. Prostaglandin transport. *Prostag Other Lipid Mediat* 2002;68–69:633–47.
- [17] Jacob JC, Haag KT, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology* 2012;77:1159–66.
- [18] Griffin PG, Carnevale EM, Ginther OJ. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. *Anim Reprod Sci* 1993;31:311–29.
- [19] Ginther OJ. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1983;19:603–11.
- [20] Griffin PG, Ginther OJ. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* 1990;34:47–56.
- [21] Cross DT, Ginther OJ. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. *J Anim Sci* 1988;66:250–4.
- [22] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2. Horses. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1995.
- [23] Gastal MO, Gastal EL, Torres CA, Ginther OJ. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology* 1998;50:989–99.
- [24] Rigby SL, Barhoumi R, Burghardt RC, Collieran P, Thompson JA, Varner DD, et al. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biol Reprod* 2001;65:740–7.
- [25] Troedsson MH, Liu IK, Ing M, Pascoe J. Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F2 α , and prostaglandin E2 on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. *Biol Reprod* 1995;52:475–88.
- [26] Leith G, Ginther O. Mobility of the conceptus and uterine contractions in the mare. *Theriogenology* 1985;24:701–11.
- [27] Stout TA, Allen WR. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction* 2002;123:261–8.
- [28] Vanderwall D, Woods G, Weber J, Lichtenwalner A. PGE2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. *Equine Vet J* 1993;25:24–7.
- [29] Watson ED, Sertich PL. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *J Reprod Fertil* 1989;87:331–6.
- [30] Piotrowska-Tomala KK, Jonczyk AW, Skarzynski DJ, Szóstek-Mioduchowska AZ. Luteinizing hormone and ovarian steroids affect in vitro prostaglandin production in the equine myometrium and endometrium. *Theriogenology* 2020;153:1–8.
- [31] McDowell KJ, Sharp DC, Grubbaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol Reprod* 1988;39:340–8.
- [32] Griffin PG, Ginther OJ. Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. *Theriogenology* 1993;39:997–1008.
- [33] Nieto-Olmedo P, Martín-Cano FE, Gaitskell-Phillips G, Ortiz-Rodríguez JM, Peña FJ, Ortega-Ferrusola C. Power Doppler can detect the presence of 7–8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. *Theriogenology* 2020;145:1–9.
- [34] 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* 2005;72:755–61.
- [35] Ginther OJ, Pierson RA. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology* 1984;21:505–16.
- [36] Ginther OJ. Ultrasonic evaluation of the reproductive tract of the mare: the singleton embryo. *J Equine Vet Sci* 1984;4:75–81.
- [37] Cardoso B, Oliveira ML, Pugliesi G, Batista E, Binelli M. Cytobrush: a tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium. *Reprod Domest Anim* 2017;52:1153–7.
- [38] Domingues RR, Ginther OJ, Gomez-León VE, Wiltbank MC. Up-regulation of endometrial oxytocin receptor is associated with the timing of luteolysis in heifers with two and three follicular waves. *Biol Reprod* 2020;102:316–26.
- [39] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction. Book 4. Color-Doppler ultrasonography. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 2007.
- [40] Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, et al. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2010;122:124–32.
- [41] Behrendt-Adam CY, Adams MH, Simpson KS, McDowell KJ. Oxytocin-neurophysin I mRNA abundance in equine uterine endometrium. *Domest Anim Endocrinol* 1999;16:183–92.
- [42] de Ruijter-Villani M, van Tol HT, Stout TA. Effect of pregnancy on endometrial expression of luteolytic pathway components in the mare. *Reprod Fertil Dev* 2015;27:834–45.
- [43] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- [44] Weber KS, Wagener K, Blanco M, Bauersachs S, Bollwein H. A comparative analysis of the intrauterine transcriptome in fertile and subfertile mares using cytobrush sampling. *BMC Genom* 2021;22:1–19.
- [45] Araújo ER, Sponchiado M, Pugliesi G, Van Hoec V, Mesquita FS, Membrane CM, et al. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:1533–44.
- [46] Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Vinales C, Tasende C, Valares JA, et al. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2006;18:447–58.
- [47] Kalpokas I, Mattos RC, Cavestany D, Martínez MN, Perdígón F, Meikle A. Effect of side of the corpus luteum and pregnancy on estrogen and progesterone receptor expression and localization in the endometrium of mares. *Theriogenology* 2018;114:221–8.
- [48] Kozai K, Tokuyama S, Szóstek AZ, Toishi Y, Tsunoda N, Taya K, et al. Evidence for a PGF2 α auto-amplification system in the endometrium in mares. *Reproduction* 2016;151:517–26.
- [49] Duong HT, Vu HV, Bah MM, Woclawek-Potocka I, Dam TV, Skarzynski DJ, et al. Acute changes in the concentrations of prostaglandin F2 α (PGF) and cortisol in uterine and ovarian venous blood during PGF-induced luteolysis in cows. *Reprod Domest Anim* 2012;47:238–43.
- [50] Zavy JT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, Sharp DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fertil Suppl* 1979:403–11.
- [51] Szóstek AZ, Galvão AM, Hojo T, Okuda K, Skarzynski DJ. Interleukins affect equine endometrial cell function: modulatory action of ovarian steroids. *Mediat Inflamm* 2014;2014:208103.
- [52] Budik S, Walter I, Leitner MC, Ertl R, Aurich C. Expression of enzymes associated with prostaglandin synthesis in equine conceptuses. *Animals* 2021;11:1180.
- [53] Silva ES, Scoggin KE, Canisso IF, Troedsson MH, Squires EL, Ball BA. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2014;151:169–81.
- [54] Klohonatz KM, Hess AM, Hansen TR, Squires EL, Bouma GJ, Brummer JE. Equine endometrial gene expression changes during and after maternal recognition of pregnancy. *J Anim Sci* 2015;93:3364–76.
- [55] Starbuck GR, Stout TA, Lamming GE, Allen WR, Flint AP. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1998;113:173–9.
- [56] Santos VG, Castro T, Bettencourt EM, Ginther OJ. Oxytocin induction of pulses of a prostaglandin metabolite and luteolysis in mares. *Theriogenology* 2015;83:730–8.
- [57] Sharp DC, Thatcher MJ, Salute ME, Fuchs AR. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. *J Reprod Fertil* 1997;109:137–44.
- [58] Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, et al. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2000;97:5936–41.
- [59] Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)–1 and –2. *J Biol Chem* 1996;271:33157–60.
- [60] Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, et al. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biol Reprod* 2004;70:391–9.
- [61] Ealy AD, Eroh ML, Sharp DC. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Anim Reprod Sci* 2010;117:99–105.