

Desenvolvimento embrionário inicial eqüino – revisão

Early equine embryonic development – a review

Ester Siqueira Caixeta^{1*}, Nadia Simarro Fagundes², Mariana Siqueira Caixeta³,
Elen Sílvia Siqueira Pyles⁴

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária, Ciências Animais, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 70910-970

²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil, 38.400-902

³Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Poços de Caldas, MG, Brasil, 37701-355

⁴Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, 18618-000

Resumo: O início da gestação eqüina envolve aspectos específicos do gênero *Equus*, como reconhecimento materno da gestação, desenvolvimento morfológico do embrião, origem dos anexos fetais, junção feto-maternal, desenvolvimento do âmnio e dos cálices endometriais, além da mobilidade e atividade fetal. No presente trabalho foi revisado o desenvolvimento embrionário inicial em eqüinos, que após a fecundação, passa pela clivagem, dando origem à mórula e mais tarde ao blastocisto, entrando no útero no dia 6 a 6,5 após a ovulação. Um fenômeno exclusivo da espécie eqüina é a retenção de ovócitos não fecundados e/ou embriões não viáveis no oviduto. Entre os dias 6 a 7 ocorre a formação de uma cápsula que envolve completamente o conceito, e no dia 8 a zona pelúcida se desprende da mesma. O conceito eqüino permanece esférico até 6 a 8 semanas de gestação. Os cálices endometriais produzem a Gonadotrofina Coriônica eqüina (eCG) durante aproximadamente os dias 33 a 120 com efeitos gonadotróficos. A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adeciduada. Ela secreta hormônios tróficos e esteróides, sendo essencial uma placenta madura e inteiramente funcional para uma gestação normal e a produção de um feto sadio e bem desenvolvido. Em vista da complexidade dos eventos relacionados e do conhecimento destas características peculiares à espécie eqüina, a fisiologia e endocrinologia da gestação na égua podem ser melhor compreendidas, sendo de grande valia na aplicação prática das biotecnologias da reprodução eqüina.

Palavras-chave: égua, embriologia, gestação, placenta.

Summary: The beginning of pregnancy in equine involves specific aspects of genus *Equus*, such as maternal recognition of pregnancy, embryo morphology development, origin of fetal placenta, fetomaternal junction, amnion and endometrial cups development, in addition to fetal mobility and activity. In the present work, embryo development in the horse was reviewed. After fertilization, the equine embryo undergoes cleavage, forming the morula and later the blastocyst, and arrives into the uterus on day 6 to 6.5 after ovulation. An exclusive characteristic is the retention of non-fertilized oocytes and/or non-viable embryos in the oviduct. Between the days 6 and 7 the formation of a capsule that involves completely the conceptus, and at day 8, the zona pellucida sheds from the capsule. The equine conceptus remains spherical until 6 to 8 weeks of pregnancy. The endometrial cups secrete equine Chorionic Gonadotropin (eCG) over approximately days 33 to 120, with gonadotrophic effects. The mare placenta is classified as epitheliochorionic, diffuse, microcotyledonary and adeciduous. It segregates trophic and steroid hormones, being essential a mature and entirely functional placenta for a normal pregnancy in the mare and production of a healthy and well developed fetus. In face of the complexity of related events and the knowledge of these peculiar characteristics of the equine species, the physiology and endocrinology of pregnancy in the mare can be better understood, being very important in the practical application of equine reproduction biotechnologies.

Keywords: mare, embryology, pregnancy, placenta.

Introdução

Muitos aspectos do início da gestação na égua mostram-se únicos no gênero *Equus* e têm importante significado prático na moderna medicina veterinária eqüina (Allen, 2000). O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do ovócito (Ginther, 1992). A partir deste momento, até o estabelecimento de uma placenta madura e funcional, aproximadamente aos 150 dias, uma série de alterações morfológicas, imunológicas e endocrinológicas ocorrem no oviduto e útero, as quais podem ser presumidas como importantes componentes do estabelecimento e

*Correspondência: ecaixeta@gmail.com
Tel: +55 (14) 3813 7787

manutenção do estado gestacional, e que diferem de eventos equivalentes em outras espécies animais domésticas (Allen, 2000). A espécie equina apresenta particularidades em relação ao desenvolvimento morfológico do embrião, à origem dos anexos fetais, à junção feto-maternal, ao desenvolvimento do âmnion e dos cálices endometriais e à mobilidade e atividade fetal, os quais serão abordados nesta revisão.

No momento apropriado o embrião deve sinalizar a sua presença no sistema materno, sinal este necessário para a manutenção do corpo lúteo, produção de progesterona e para a continuação do desenvolvimento do endométrio e da sua atividade secretora. Outros sinais utilizados pelo embrião como síntese de hormônios e proteínas parecem também serem responsáveis pelo reconhecimento materno da gestação, sendo alvo de estudos e pesquisas.

A placenta é muito estudada na gestação equina, tanto no aspecto anatômico quanto fisiológico. As pesquisas realizadas nessa área são direcionadas às estruturas únicas na placenta da égua como os cálices endometriais e cinta coriônica, à produção da Gonadotrofina Coriônica equina (eCG) e às seis camadas de tecido entre os capilares materno e fetal (Ginther, 1992).

O presente trabalho tem o intuito de revisar o desenvolvimento embrionário desde a fecundação até a placentação inicial. Através do conhecimento destas características peculiares à espécie equina, a fisiologia e endocrinologia da gestação podem ser melhor compreendidas, sendo de grande valia na aplicação prática das biotecnologias da reprodução equina.

Fecundação

A fecundação ocorre quando há fusão do ovócito com o espermatozóide. Para tanto, é necessário que ocorra a migração espermática entre as células do cumulus, a união da cabeça do espermatozóide à zona pelúcida e em seguida a penetração espermática por uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica e, por último, a fusão dos gametas (Hafez e Hafez, 2004).

No momento da ovulação ocorre a liberação do ovócito maturado, o qual foi submetido a transformações durante o desenvolvimento folicular, como a formação da zona pelúcida e a retomada e finalização da primeira divisão meiótica, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, em preparo para a fecundação. A placa metafásica marca o início da segunda divisão meiótica, porém a meiose não pode continuar até que ocorra a penetração do espermatozóide no ovócito (Ginther, 1992).

Para atingir a capacidade de fecundação os espermatozóides passam por várias modificações seqüenciais incluindo a maturação, capacitação e a reação do acrossoma. Os componentes de sua superfície são modificados ou removidos pelas secreções do

trato genital feminino, desestabilizando a bicamada fosfolipídica e permitindo a ativação do acrossomo. A capacitação desencadeia a reação acrossomal que envolve a fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana externa do acrossomo, seguida por uma extensa vesiculação sobre o segmento anterior do acrossomo. Essa reação promove a liberação de enzimas hidrolíticas, como, hialuronidase e acrosina que são necessárias para a penetração no ovócito (Hafez e Hafez, 2004).

A união da cabeça espermática à zona pelúcida é regida por receptores espermáticos específicos na sua superfície. A zona pelúcida é sintetizada por ovócitos em maturação, sendo sua matriz extracelular constituída por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, presentes em todas as espécies de mamíferos. As ZP1 e ZP2 são glicoproteínas estruturais, enquanto a ZP3 age como receptor espermático (Herrler e Beier, 2000; Hafez e Hafez, 2004).

Apenas espermatozóides com acromossos intactos podem se ligar à ZP3. A ligação da cabeça espermática à ZP3 permite interações com outras zonas competentes que estimulam a ativação do acrossoma, liberando enzimas que digerem uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica (Hafez e Hafez, 2004). A região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica estimulando a retomada da segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar (Ginther, 1992; Hafez e Hafez, 2004).

Os dois pró-núcleos, masculino e feminino migram para o centro do ovo, os envelopes nucleares se rompem e então se fundem, formando um núcleo diplóide e a primeira célula do conceito, o zigoto. Esta fusão, chamada singamia, finaliza a fecundação e estimula o zigoto a iniciar o seu desenvolvimento (Ginther, 1992; Hafez e Hafez, 2004).

Após a fecundação ocorrem modificações na superfície do ovócito para impedir a fusão de outro espermatozóide, a polispermia (Herrler e Beier, 2000). O início do bloqueio ocorre com a penetração do espermatozóide no ovócito, quando os grânulos corticais são liberados dentro do espaço perivitelínico. A liberação do conteúdo desses grânulos provoca uma reorganização extensa da zona pelúcida e/ou reação cortical da superfície vitelina, resultando na liberação de enzimas que provocam endurecimento da zona pelúcida e inativação dos receptores espermáticos (Hafez e Hafez, 2004).

Clivagem

Depois do estágio de zigoto, os embriões sofrem uma série de divisões mitóticas. A primeira clivagem do embrião equino ocorre 24 horas após a fecundação (Herrler e Beier, 2000). O zigoto, estágio de uma célula, é bastante grande, possuindo uma proporção nuclear/citoplasmática baixa. Nessas divisões celu-

lares não ocorre aumento da massa celular, sendo que o diâmetro do ovócito pré-ovulatório, zigoto e embrião clivado não se altera, até a formação de um blastocisto, geralmente após deixar o oviduto (Ginther, 1992; Betteridge, 2000).

A clivagem do zigoto se dá por divisão vertical e as células irmãs resultantes são denominadas blastômeros. As divisões iniciais ocorrem simultaneamente em todos os blastômeros, porém, após algum tempo essa sincronização é perdida. O processo de clivagem do embrião eqüino é similar ao observado nos demais mamíferos. Entretanto, nessa espécie ocorre um excessivo processo de deutoplasmólise através da qual se observa a extrusão do material embrionário para o espaço perivitelínico, desde os primeiros estágios de desenvolvimento. A partir do estágio de 16 blastômeros o material extrusado vai diminuindo e desaparece. O processo de deutoplasmólise parece estar associado à quantidade de lipídeos presente no ovócito. Em ovócitos particularmente ricos em lipídeos, como os de eqüino, bastante material é eliminado durante a segmentação (Ginther, 1992).

Compactação

Os blastômeros de mamíferos, até o estágio de 8 células, formam um arranjo frouxo, com espaço abundante entre eles. Em seguida à terceira clivagem ocorre uma grande alteração no comportamento dos blastômeros. Eles repentinamente se aglomeram maximizando o contato entre si, formando uma massa esférica compacta de células. Este arranjo compacto é estabilizado por junções que se formam entre as células externas da massa celular. As células internas da esfera formam junções do tipo "gap", permitindo deste modo, o transporte de pequenas moléculas e íons entre as células (Hafez e Hafez, 2004).

Aproximadamente 4 a 5 dias após a fecundação, o embrião apresenta-se com 16 a 32 células (Ginther, 1992). Uma vez que o embrião tenha formado 16 blastômeros, ele é denominado mórula (Herrler e Beier, 2000). Durante esta fase o embrião é transportado do local da fecundação, região da ampola do oviduto, em direção ao útero, onde deve ocorrer o desenvolvimento da gestação (Betteridge, 2000).

Transporte do embrião no oviduto

Segundo Allen (2000; 2001) existem diferenças importantes no transporte de ovócitos e embriões no oviduto eqüino quando comparado às outras espécies de mamíferos. Um fenômeno exclusivo é a retenção de ovócitos não fecundados ou embriões não viáveis no oviduto, sendo que estes podem ser retidos por até sete meses ou mais e são eventualmente degenerados. Essa retenção ocorre nas dobras tortuosas da mucosa do oviduto, podendo o ovócito se alojar no terço médio do oviduto ou na região da junção ístimo-

ampola (Ginther, 1992; Allen, 2000; Betteridge, 2000; Allen, 2001). Por outro lado, se o ovócito é fecundado, resultando em um embrião, eles atravessam a apertada e proeminente junção útero-tubária, entrando no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação (dia 6 - 6,5) no estágio de desenvolvimento de mórula tardia ou blastocisto inicial (Betteridge *et al.*, 1982; Allen, 2000; Betteridge, 2000; Allen, 2001).

Vários autores observaram que o embrião viável começa a secretar grande quantidade de PGE₂ quando atinge o estágio de mórula compacta, no dia 5 após a ovulação (Ginther, 1992; Allen, 2000; Betteridge, 2000; Sharp, 2000; Allen, 2001; Stout e Allen, 2001, 2002). Essa PGE₂ tem a propriedade de provocar contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, atuando na parede do oviduto, permitindo assim que o embrião se mova progressivamente com o auxílio do batimento ciliar rítmico, entrando no útero aproximadamente após 24 horas (Gastal *et al.*, 1998). Desta forma, este estágio de desenvolvimento depende da capacidade secretória de PGE₂ pelo embrião (Allen, 2000).

A permanência do embrião eqüino no oviduto até o dia 6 é considerada prolongada, quando comparada com a permanência do embrião suíno (48 horas) e de ruminantes (72 horas) (Allen, 2000). Este fato traz desvantagens na aplicação prática das biotecnologias da reprodução eqüina. Um exemplo é a bipartição de embriões para a produção de gêmeos monozigotos, que tem maior sucesso quando realizada no estágio de mórula, sendo que este índice cai consideravelmente se o embrião é bipartido mesmo com sinais iniciais de blástula. De modo similar, o sucesso da congelação de embriões cai quando se tem um pequeno aumento no desenvolvimento, idade e tamanho do embrião, provavelmente devido a uma combinação de danos na massa celular interna e à impermeabilidade relativa da cápsula do blastocisto eqüino aos crioprotetores (Allen, 2000, 2001).

Blastocisto

Simultaneamente com o desenvolvimento das junções intercelulares compactas da mórula, ocorre o acúmulo de fluido no interior da cavidade central formando a blastocele. Quando esta é detectada, o conceito é denominado blastocisto inicial (Ginther, 1992). A relação temporal entre o surgimento da blastocele e a entrada no útero não está completamente determinada, sendo possível chegar no útero um embrião no estágio de mórula tardia ou blastocisto inicial. O conceito entra no útero no dia 6, quando tem aproximadamente 0,2 mm (Betteridge *et al.*, 1982; Sharp, 2000).

De acordo com Ginther (1992) as células do embrião nessa fase se diferenciam em dois grupos, o trofoblasto e o embrioblasto. O trofoblasto é originado a partir das células da massa celular externa, sendo

constituído por células colunares recobertas por densas microvilosidades e que tem funções na captação de nutrientes seletivos. Este grupo de células forma o córion, a porção embrionária da placenta, que permite ao feto obter oxigênio e alimento a partir da mãe. Estas células do trofoblasto são necessárias para a implantação do embrião na parede uterina.

O embrioblasto, que se projeta para o interior da blastocele é formado a partir da massa celular interna (MCI) e originará o embrião propriamente dito. As células do interior da MCI são redondas, pequenas e se dividem rapidamente. Elas são unidas por junções do tipo "gap" e interconectadas por uma elaborada cadeia de microvilos longos e sintetizam proteínas diferentes em relação ao trofoblasto. A principal característica do blastocisto é a diferenciação em trofoblasto e botão embrionário. O embrioblasto se desenvolve em 3 camadas germinativas primárias do embrião (ectoderme, mesoderme e endoderme) durante o processo de gastrulação (Ginther, 1992).

O diâmetro da vesícula embrionária nos próximos dias varia bastante e o estágio de desenvolvimento parece mais relacionado com o diâmetro e morfologia do que com a idade (Ginther, 1992).

Surgimento da cápsula e desprendimento da zona pelúcida

O desenvolvimento inicial do embrião eqüino é caracterizado pela formação de uma cápsula que envolve completamente o concepto. A cápsula é uma fina camada acelular e transparente depositada entre a zona pelúcida e o trofoblasto no momento da formação do blastocisto intra-uterino no dia 6 ou 7 após a ovulação, sendo composta por glicoproteínas semelhantes à mucina produzidas pelo trofoblasto (Betteridge *et al.*, 1982; Ginther, 1992; Oriol *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1997; Allen, 2001). Pode haver também um envolvimento uterino na origem da cápsula, pois foi observado no cultivo *in vitro* de embriões pré-capsulares que não houve a formação da mesma. A cápsula é demonstrada com dificuldade *in vitro*. A zona pelúcida provavelmente não é necessária na formação da cápsula, uma vez que blastocistos sem zona pelúcida transferidos no dia 7 têm a cápsula aparentemente normal quando examinados uma semana depois (Ginther, 1992).

O blastocisto se expande rapidamente após sua entrada no útero, ocorrendo uma diminuição na espessura da zona pelúcida. Desta forma ela se desprende da cápsula em poucos dias (dia 8), a cápsula então permanece no exterior, revestindo completamente o embrião (Ginther, 1992; Crossett *et al.*, 1998; Betteridge, 2000; Stout *et al.*, 2005). A presença da cápsula contribui para esse afrouxamento e perda da zona pelúcida (Stout *et al.*, 2005).

Alguns estudos sugerem que a mucina capsular seja

secretada em maior parte pelo trofoblasto (Arar *et al.*, 2007), entretanto a cápsula também contém outras proteínas de origem materna. A produção de mucina é observada após a formação do blastocisto, aumentando até o dia 18, e então começa a diminuir, antes de desaparecer completamente entre os dias 21 e 23 (Stewart *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1997; Stout *et al.*, 2005).

Especula-se que a função da cápsula seja semelhante à da zona pelúcida, substituindo-a após a sua perda (Ginther, 1992). Ela tem uma grande responsabilidade na manutenção da forma esférica do concepto durante o período do reconhecimento materno da gestação. Embora fina, a cápsula é bastante resistente e elástica funcionando como uma proteção física ao concepto durante a fase de migração permitindo com que ele migre de uma extremidade à outra no lúmen uterino (Oriol *et al.*, 1993; Betteridge, 2000; Sharp, 2000; Arar *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2007), atuando como uma molécula anti-adesiva com alta concentração de ácido siálico (Chu *et al.*, 1997; Sharp, 2000; Stout *et al.*, 2005). Além disso, a cápsula atua fornecendo proteção contra o estresse mecânico das contrações miométrias (Stout *et al.*, 2005) e também funcionando como uma defesa biológica contra ataques virais e bacterianos ou ataque imunológico materno. Finalmente, a posição da cápsula na interface materno-fetal sugere que ela tenha uma importante função na comunicação entre mãe e feto durante o início da gestação (Stewart *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1997).

A fixação do embrião no futuro local da placentação está associada a uma flacidez e perda de ácido siálico das glicoproteínas capsulares (Oriol *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1997; Arar *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2007). Segundo Stewart *et al.* (1995), uma grande quantidade de proteína de 19 kDa (p19) é secretada pelo endométrio. Foi sugerido que essa proteína possa ser incorporada dentro da estrutura capsular durante sua fase de crescimento, depois do dia 11. A secreção da p19 pelo endométrio é dependente de progesterona. A administração de prostraglandinas reduz a concentração de progesterona, reduzindo a secreção da p19. Portanto, cápsulas defeituosas, com deficiência da p19, mostram uma falha na perda de ácido siálico, refletindo a possibilidade de que a falta ou mudança de proteínas na estrutura capsular impeçam a queda de ácido siálico, interferindo no processo de fixação do embrião (Arar *et al.*, 2007).

Segundo Stout *et al.* (2005) através da remoção da cápsula e posterior transferência dos embriões em éguas receptoras foi demonstrado que nenhum embrião desprovido da cápsula desenvolveu a gestação, enquanto os embriões que não tiveram a cápsula removida desenvolveram normalmente a gestação, comprovando que ela é essencial na viabilidade dos embriões eqüinos.

Desenvolvimento do saco vitelínico

Uma alteração relativa no tamanho da vesícula embrionária no estágio de saco vitelínico pode ser vista à ultra-sonografia nos dias 10 a 21 (Ginther, 1992). Um dos aspectos distintos do conceito equino é o saco vitelínico persistente. Muitas espécies animais desenvolvem o saco vitelínico, mas ele rapidamente se torna afuncional e aparentemente não contribui para a nutrição do embrião. Nos eqüinos, entretanto, ele é uma estrutura predominante nas primeiras três ou quatro semanas de gestação e tem um importante papel no suprimento nutricional inicial do embrião (Sharp, 2000).

Um revestimento interno de células endodérmicas completam a conversão do blastocisto em um saco embrionário vitelínico bilaminar (duas paredes), essas células são originadas do embrioblasto ou massa celular interna e envolvem a blastocele, desenvolvendo uma membrana contínua que irá se tornar um constituinte do saco vitelínico (Sharp, 2000). O lúmen do saco vitelínico está diretamente em contato com o lúmen do intestino primitivo e, portanto, solutos orgânicos e inorgânicos e água do ambiente uterino são absorvidos pelo saco vitelínico tornando-os disponíveis para o embrião (Ginther, 1992).

As células internas ou revestimento endodermal do saco vitelínico são cuboidais, enquanto as células do trofoblasto são colunares com característica absorptivas. A terceira camada, mesoderme, começa a aparecer entre o trofoblasto (ectoderme) e a endoderme do saco vitelínico, dando origem à parede do disco embrionário. A formação da mesoderme provavelmente começa no dia 14 (Sharp, 2000). O conceito equino com duas semanas de gestação é esférico e está localizado no corpo uterino. O tecido mesodérmico cresce do disco embrionário para a área entre o trofoblasto e a endoderme do saco vitelínico. A mesoderme dá origem ao mesênquima de sustentação ou aos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo (Hafez e Hafez, 2004).

Ilhas de sangue são formadas na mesoderme e estas gradualmente aumentam originando a parede funcional do saco vitelínico que está conectada por um canal ao embrião. O saco vitelínico não armazena nutrientes, mas com a vascularização o material nutritivo chega rapidamente e com eficiência para abastecer o desenvolvimento embrionário (Ginther, 1992). A principal extremidade da vascularização da mesoderme é demarcada por uma proeminente coleção de veias denominada *sinus terminalis*. A parede do saco vitelínico entre o *sinus terminalis* e o embrião propriamente dito possui três camadas (endoderme, mesoderme e ectoderme) e é denominada onfalopleura trilaminar. A parede distal é formada por duas camadas (ectoderme e endoderme) e é denominada onfalopleura bilaminar (Ginther, 1992; Hafez e Hafez, 2004).

A onfalopleura bilaminar e o *sinus terminalis* são estruturas anatômicas muito importantes, que indicam o lado oposto ao desenvolvimento embrionário propriamente dito, e que mais tarde marcam a posição de fixação do cordão umbilical no feto (Ginther, 1992).

Transição de saco vitelínico para saco alantóide

Com o desenvolvimento do embrião, o trofoblasto funde-se com a membrana interna de células da mesoderme formando o córion. Este envolve externamente todo o embrião e as outras três membranas fetais: o âmnio, o saco vitelínico e o alantóide. Este último é o responsável pelas mudanças fisiológicas que surgem a partir do dia 21 (Ginther, 1992). Ocorre uma repleção da cavidade amniótica e a emergência do alantóide a partir do intestino que cresce para dentro do exoceloma, entre a somatopleura e a esplancnopleura (Hafez e Hafez, 2004).

Segundo Sharp (2000) durante as primeiras três ou quatro semanas de gestação a placenta equina pode ser descrita como corio-vitelínica. Ela se torna alanto-coriônica devido à predominância do saco alantóide, o qual consiste da endoderme, mesoderme e ectoderme, constituindo o alanto-córon.

O âmnio se desenvolve a partir da ectoderme extra-embrionária e da mesoderme avascular circundando completamente o embrião. O líquido amniótico é considerado como produto de secreções das paredes ou folhetos amnióticos, bem como pela saliva, secreção nasal do feto e temporariamente pela urina. O feto flutua neste líquido, sendo protegido da desidratação e de choques mecânicos (Ginther, 1992).

Na fenda existente entre o folheto interno e externo do âmnio encaixa-se, como parte da bexiga fetal, o saco alantóide, que se compõe também de um folheto interno que se apresenta bem junto ao interno do âmnio formando o alanto-âmnio. E um folheto externo que se adere ao córion, formando o alanto-córon. Dando origem assim a uma placenta alanto-coriônica. Entre o alanto-córon e o alanto-âmnio encontra-se o espaço alantoideano que envolve totalmente o embrião. O líquido alantoideano é de origem renal, geralmente composto pela urina fetal (Ginther, 1992).

O conceito equino permanece esférico até 6 a 8 semanas de gestação, em contradição com as outras espécies domésticas nas quais o alanto-córon expande e alonga tremendamente nas primeiras duas semanas de gestação. Este aspecto morfológico está associado à extrema mobilidade intra-uterina do conceito equino até os dias 16 ou 17 (Sharp, 2000).

O exoceloma está localizado entre a somatopleura e esplancnopleura. A somatopleura é uma parede formada pela mesoderme e uma camada de trofoblasto. Já a esplancnopleura é formada pela mesoderme e uma camada de endoderme. No dia 24 ou 25 o saco

alantóide já está vascularizado e grande se comparado com o embrião propriamente dito. No dia 25 o embrião tem aproximadamente 5 mm de comprimento, crescendo cerca de 1 mm ao dia até os 12 mm no dia 30, e 17 mm no dia 35. O batimento cardíaco do embrião e a passagem de sangue no sistema circulatório podem ser detectados ao redor do dia 26, sendo um critério importante para estimativa da viabilidade fetal (Ginther, 1992).

Uma fita de células coriônicas de 1 mm de largura forma-se ao redor do embrião. Essa fita coriônica localiza-se entre o saco alantóide e o saco vitelínico, sendo que a mesoderme nessa área permanece avascular (Lunn *et al.*, 1997).

O alantóide continua a crescer e o saco vitelínico regride gradualmente, pois fica preso na onfalopleura bilaminar, reduzindo a proporção da vesícula embrionária. O embrião é levado durante o crescimento do alantóide para o pólo oposto; essa ascendência inicia-se em torno dos dias 22 a 25 (Hafez e Hafez, 2004).

No dia 40 (final do estágio de embrião) o embrião e seu âmnio já foram movidos para o pólo oposto e o saco vitelínico desaparece, sendo sua função substituída pela placenta. Nessa fase o embrião parece estar suspenso pelo alantóide, flutuando dentro de um saco aneóico. Devido ao crescimento do saco alantóide, as membranas que separavam o saco vitelínico e o saco alantóide se encontram no pólo dorsal da vesícula, resultando na formação de um cordão umbilical; por essa razão o cordão se anexa no lado dorsal do útero (Ginther, 1992).

O cordão umbilical estabelece a ligação entre os envoltórios fetais e o produto (feto). As células da fita coriônica invadem o endométrio para formar os cálices endometriais (de Mestre *et al.*, 2008); apenas uma camada simples de trofoblasto permanece (Ginther, 1992).

Formação e função dos cálices endometriais

As alterações endocrinológicas que ocorrem na égua durante a gestação são típicas desta espécie. Um fato bastante importante é o desenvolvimento, função, manutenção e finalmente a degradação dos cálices endometriais, que são estruturas temporárias produtoras do hormônio eCG (Ginther, 1992; de Mestre *et al.*, 2008).

Após a ovulação, o corpo lúteo primário passa a produzir progesterona. Esta produção atinge concentrações plasmáticas de 6 a 10 ng/mL no dia 5 após a ovulação e continuam, na égua prenhe, a crescer até os 35 a 40 dias de gestação quando a eCG começa a ser produzida pelos cálices endometriais (Lunn *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 2002b). No início do segundo mês de gestação os cálices endometriais são formados. Estes correspondem a formações discretas, pequenas

protuberâncias de tecido altamente compacto, semelhantes a um anel, presentes na porção caudal do corno gravídico, resultantes da invasão de células trofoblásticas para dentro do endométrio (Ginther, 1992; Lunn *et al.*, 1997; Sharp, 2000; Wooding *et al.*, 2001; Hafez e Hafez, 2004).

A égua possui uma placenta do tipo epiteliocorial, que representa a forma menos invasiva de placentação (Lunn *et al.*, 1997). No entanto, uma sub-população de células trofoblásticas altamente invasivas se diferenciam entre os dias 25 e 36 de gestação para formar uma faixa avascular composta por um tecido denominado cinta coriônica que circunda o concepto esférico na região entre o alantóide em formação e o saco vitelínico em regressão (Ginther, 1992; Lunn *et al.*, 1997; Adams e Antazak, 2001; Wooding *et al.*, 2001; de Mestre *et al.*, 2008). Ao contrário das demais células não invasivas do trofoblasto equino, as células da cinta coriônica começam a se fixar e invadir o epitélio uterino ao redor dos 35 dias de gestação (Lunn *et al.*, 1997; Wooding *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2002b).

Segundo Ginther (1992), a formação histológica das células cálices pode ser dividida em 5 fases: fixação, invasão, fagocitose, migração e diferenciação. A cinta coriônica inicialmente consiste em um envoltório raso e em seguida vai se alongando como estruturas vilosas, ao redor do dia 33 (de Mestre *et al.*, 2008). A fixação ocorre no dia 37 e consiste numa ligação entre as interdigitações da superfície das células coriônicas alongadas com os dentículos correspondentes do epitélio endometrial. As células trofoblásticas invadem o endométrio para a penetração do citoplasma nas células epiteliais. Quando a invasão é concluída, somente uma minoria das milhares de células da cinta são transformadas em células cálices, as células da cinta que não invadem sofrem necrose.

Continuando a invasão, as células da cinta seqüestram e fagocitam as células epiteliais rompidas e desorganizadas (Ginther, 1992). O processo de invasão destrói o epitélio endometrial em contato com as células da cinta, no entanto, o epitélio se regenera rapidamente e recobre a face luminal dos cálices endometriais ao redor do dia 45, deixando este tecido completamente separado da placenta (Lunn *et al.*, 1997). A fase de migração envolve penetração das células trofoblásticas e seu conteúdo na membrana basal do epitélio uterino, atingindo o estroma endometrial, entre as glândulas endometriais, formando nódulos distintos de 0,5 a 1,0 cm na superfície do endométrio, os quais circundam o concepto na base do corno uterino gravídico, denominados cálices endometriais (Ginther, 1992; Lunn *et al.*, 1997; Adams e Antazak, 2001). A invasão cessa após a infiltração no estroma endometrial e então as células trofoblásticas se hipertrofiam e diferenciam nas células cálices maduras (Ginther, 1992).

As células da cinta coriônicas possuem um grande

núcleo e nucléolo. Sua matriz extracelular provavelmente tem, além da função de adesivo durante a fase de fixação, a função de digestão dos fragmentos das células epiteliais (Ginther, 1992). Elas se diferenciam em células secretórias binucleadas durante a formação dos cálices endometriais, e secretam eCG durante aproximadamente os dias 33 a 120 da gestação (Lunn *et al.*, 1997; Adams e Antazak, 2001; Wooding *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2002b; de Mestre *et al.*, 2008). A quantidade secretada é grande e provavelmente uma importante parte no desenvolvimento do contato feto-maternal, necessário para o sucesso da gestação (Wooding *et al.*, 2001). A sua concentração permanece alta até 90 dias, após esse período declina e aos 150 dias está ausente. O pico de secreção de eCG ocorre ao redor dos 55 a 70 dias de gestação e corresponde ao período de tamanho máximo dos cálices endometriais (Allen, 2000).

A eCG é um hormônio glicoprotéico com alto peso molecular que possui uma função complexa, a qual não é totalmente entendida. É conhecido que quando administrado a outras espécies, ela tem efeitos gonadotróficos, tanto de FSH, como de LH (Lunn *et al.*, 1997; Allen, 2001). Na égua, em associação com gonadotrofinas da hipófise, a eCG estimula a formação de corpos lúteos acessórios através da luteinização, com ou sem ovulação, dos folículos das ondas foliculares (Ginther, 1992; Lunn *et al.*, 1997; Wooding *et al.*, 2001; Allen, 2001; de Mestre *et al.*, 2008). Desta forma, aos 40 dias de gestação a concentração de progesterona sérica dobra seu valor (Lunn *et al.*, 1997).

Os corpos lúteos acessórios aumentam em número e persistem até a metade da gestação, quando a placenta já está madura o suficiente para assumir inteiramente o suprimento de progesterona para a manutenção da gestação, sem qualquer ajuda dos ovários (Allen, 2000; Allen, 2001; Hafez e Hafez, 2004).

A partir dos 80 a 90 dias de gestação, ocorre a regressão dos tecidos dos cálices associada a uma intensa resposta leucocitária materna (Lunn *et al.*, 1997; Sharp, 2000; Adams e Antazak, 2001; Wooding *et al.*, 2001). Apreciável número de leucócitos maternos, incluindo linfócitos, plasma celular e eosinófilos se acumulam na base dos cálices endometriais para formar um tipo de barreira imunológica entre os tecidos materno e fetal (Allen, 2000; Allen, 2001), degenerando e destruindo os cálices, sendo restabelecida a passagem dos ductos obstruídos das glândulas endometriais (Allen, 2000).

Os leucócitos maternos invadem o tecido dos cálices e destroem as células fetais, formando um tecido necrótico que aflora na superfície endometrial, dando origem à estruturas pedunculadas no alanto-córion, que se projetam para o interior da cavidade alantóide, as chamadas bolsas alantocoriônicas (Lunn *et al.*, 1997; Allen, 2000).

Reconhecimento materno da gestação

Allen (2000; 2001) utiliza o termo reconhecimento materno da gestação para comparar as diferentes estratégias utilizadas pelas espécies domésticas para garantir a continuação da vida e da função secretória do corpo lúteo, e então manter o útero em um estágio progestacional adequado para o suporte da gestação e crescimento do feto. A secreção de progesterona é indispensável para a manutenção da gestação (Ginther, 1992; Sharp, 2000).

A Prostaglandina F₂ (PGF₂) é o hormônio luteolítico que induz a regressão cíclica do corpo lúteo, ela é secretada pelo endométrio após o diestro (Allen, 2000; Hafez e Hafez, 2004). Portanto, o crescimento do concepto equino depende da supressão de sua liberação pelo endométrio (Stout e Allen, 2002).

A égua é provida de uma distinta e aparentemente única maneira pela qual o embrião possui uma total importância no sinal do reconhecimento materno da gestação (Allen, 2000). O embrião equino é envolto por uma resistente e ajustada cápsula de glicocálice entre os dias 6,5 a 22 após a ovulação, sendo incapaz de reorganizar e alongar o trofoectoderma entre os dias 10 e 14 após a ovulação, permanecendo esférico e completamente solto dentro do lúmen uterino (Allen, 2000; Allen e Stewart, 2001) onde ele se move continuamente de uma extremidade à outra do útero levado por fortes contrações peristálticas do miométrio, nos dias 9 a 17 após a ovulação (Ginther, 1983; Leith e Ginther, 1984; Gastal *et al.*, 1998; Allen, 2000; Allen e Stewart, 2001; Stout e Allen, 2001, 2002).

Este processo incomum de mobilidade do concepto na égua persiste até o dia 16 ou 17 após a ovulação, quando ocorre um rápido aumento no diâmetro do embrião e um súbito espasmo que aumenta o tônus miometrial e fixa o concepto no eventual local de implantação, na base de um dos cornos uterinos (Ginther, 1983; Leith e Ginther, 1984; Allen, 2000; Sharp, 2000; Allen, 2001; Stout e Allen, 2001, 2002).

Está claro que este constante movimento do concepto é uma adaptação evolucionária que garante ao embrião o sinal de reconhecimento materno da gestação por toda a extensão do útero (Allen, 2000), levando a uma supressão na liberação cíclica de PGF₂ pelo endométrio, permitindo a luteostase necessária para a manutenção da gestação (Ginther, 1983; Sharp, 2000; Stout e Allen, 2001). A restrição cirúrgica do embrião equino em um terço da área total uterina é seguida por luteólise e um retorno ao cio no período esperado do ciclo estral (Allen, 2000; Sharp, 2000). A ausência de qualquer barreira física que possa impedir o concepto de se movimentar livremente de uma extremidade à outra no lúmen uterino é um pré-requisito para a manutenção da gestação nos equinos. Alterações dentro do

endométrio, bem como grandes cistos ou septos endometriais, podem contribuir para um insuficiente reconhecimento materno e subsequente perda da gestação (Allen, 2001).

Outra diferença na égua é a habilidade do concepto equino em secretar grande quantidade de PGF₂ e Prostaglandina E₂ (PGE₂) tanto *in vivo* como quando cultivado *in vitro* (Allen, 2000; Allen, 2001). A produção de prostaglandinas pelo concepto é alta no dia 10 após a ovulação, elevando significativamente em função do aumento da idade gestacional (Stout e Allen, 2001; Stout e Allen, 2002). As prostaglandinas secretadas pelo concepto inicial aparentemente derivam da membrana corio-vitelinca (Allen, 2000; Allen, 2001; Stout e Allen, 2002) e não têm acesso à circulação sistêmica em quantidade suficiente que comprometa a função do corpo lúteo. A função destas prostaglandinas não é completamente definida (Stout e Allen, 2002), porém tem sido proposto que elas são necessárias para simular localmente as contrações peristálticas (tubáricas e uterinas) e o relaxamento do miométrio requeridos para propulsar o concepto de uma extremidade à outra no lúmen uterino (Allen, 2000; Stout e Allen, 2001; Stout e Allen, 2002). Também é possível que essas prostaglandinas produzidas tenham outras funções, como promover a rápida expansão do blastocisto inicial e aumentarem o fluxo sanguíneo uterino e a permeabilidade vascular, facilitando a distribuição de nutrientes para o desenvolvimento do concepto (Stout e Allen, 2002).

Na natureza, o sinal pelo qual o embrião equino informa bioquimicamente a égua da sua presença no útero para completar a necessária luteostase ainda é desconhecido (Allen, 2000; Betteridge, 2000). Diferente dos ruminantes, o concepto equino não produz a molécula protéica interferon tau com propriedade luteostática, mas semelhante ao embrião suíno, ele começa a secretar estrógeno desde os sete dias após a ovulação e, portanto, inicialmente acreditou-se que essa seria a substância que teria a função do interferon tau no reconhecimento materno da gestação no equino (Allen, 2000; Allen, 2001; Raeside *et al.*, 2002, 2004; Hafez e Hafez, 2004). A produção de estradiol pelo concepto equino inicial é significativa para o estabelecimento da gestação, porém sua exata função no processo ainda não está bem determinada. Uma das funções do estrógeno é a de mediador local nos tecidos e desempenha também uma contribuição essencial na comunicação materno-fetal na placenta epiteliocorial (Raeside *et al.*, 2002, 2004).

Alguns experimentos mostraram que um processo gradual permite a queda de receptores para a ocitocina no endométrio entre os dias 10 e 16 após a ovulação (Allen, 2000; Betteridge, 2000; Allen e Stewart, 2001) reduzindo potencialmente a cascata do ácido aracdônico que em adição à produção de um inibidor da síntese de prostaglandinas bloqueiam a conversão do ácido aracdônico na potente PGF, auxiliando na

manutenção do corpo lúteo (Sharp, 2000).

Uma elevada taxa na perda de gestação na égua (32%) ocorre entre os dias 12 e 30 após a ovulação, por não suportar uma deficiência na liberação do fator de reconhecimento materno da gestação pelo concepto, impedindo a ação cíclica da prostaglandina, a qual ganha acesso à circulação periférica, através da veia uterina, e acidentalmente induz a luteólise do corpo lúteo equino (Allen e Stewart, 2001).

Nos últimos anos caracterizou-se uma molécula de proteína como sendo a responsável pelo reconhecimento materno da gestação nos equinos. Ocorre uma maior produção de proteínas totais e específicas intra-uterinas nos dias do reconhecimento materno da gestação. Na espécie equina a PGF₂ é produzida pelo útero ao redor do dia 14 após a ovulação provocando a regressão do corpo lúteo. A maior produção do fator de inibição de produção de prostaglandina ocorre nos dias 12 e 13 pós-ovulação, sendo que no dia 16 esses níveis não são mais significativos. Isso indica uma onda de supressão justamente no momento em que ocorreria o pico de produção de PGF₂ (Sharp, 2000).

Embora o estrógeno sozinho não seja responsável pela sinalização materna da gestação em equinos, ele parece estar envolvido. Altas concentrações de estrógeno, associadas ao aumento da progesterona levam a um aumento considerável na produção de uteroferrinas (Ellenberger *et al.*, 2008), e estas parecem ser as proteínas responsáveis pelo reconhecimento materno da gestação (Sharp, 2000).

Placentação inicial

A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adediuada (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). Na égua, a aderência placentária ocorre somente por volta dos dias 24 a 40 (Hafez e Hafez, 2004). Este tipo de placentação é não invasiva e produz uma mínima resposta celular materna (Ginther, 1992; Gerstenberg *et al.*, 1999).

A placenta equina é classificada como epiteliocorial uma vez que o epitélio uterino está em contato com a camada do córion, apresentando, portanto, seis camadas de tecido entre os capilares materno e fetal (endotélio, tecido conjuntivo e epitélio), por isso, nesta espécie não ocorre a passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto, sendo a administração do colostro muito importante. A classificação difusa se deve ao fato de que a vilosidade do córion está distribuída uniformemente sobre toda a superfície de tecido materno, formando pequenos agrupamentos dos vilos aparentando microcotilédones (Allen *et al.*, 2002a). A característica adediuada da placenta se deve ao fato de não ocorrer perda de tecido materno durante o parto (Ginther, 1992; Gerstenberg *et al.*, 1999).

A adesão precoce ocorre por meio de uma interdigitação entre a superfície epitelial da vesícula embrião-

nária e o revestimento uterino. Com a contínua expansão da placenta por todo o útero, a justaposição dos microvilos do córion com o epitélio uterino torna-se mais complexa para permitir o aparecimento de milhares de estruturas microcoteledonárias que prendem firmemente a placenta (Ginther, 1992; Sharp, 2000; Allen, 2001; Allen *et al.*, 2002a; Hafez e Hafez, 2004).

A placentação envolve um aumento e uma reorganização consideráveis em ambos os tecidos, materno e fetal (Gerstenberg *et al.*, 1999). Como estruturas distintas da placenta equina madura, os microcotilédones são completamente formados no quinto mês de gestação. As dobras primárias do trofoblasto são subdivididas com a progressão da gestação. Estas modificações são reflexos das estruturas das criptas maternas que recebem os vilos fetais. Dentro de cada microcotilédone, os epitélios coriônico e uterino estão em contato íntimo e a junção do microvilo é formada entre os limites materno-fetais (Allen, 2001; Hafez e Hafez, 2004; Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). Cada microcotilédone é suprido por uma artéria maternal e uma equivalente artéria da placenta fetal (Allen, 2001; Wilsher e Allen, 2003).

As funções da placenta são diversas e incluem nutrição e respiração fetal (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006), retirada de detritos, e segurança de que o feto seja protegido da resposta imune materna, que é direcionada contra o feto ou antígenos placentários (Ginther, 1992).

Em éguas a gestação gemelar é rara, devido à competição entre as placentas pelo contato com o endométrio materno, resultando em insuficiência placentária para ambos os conceptos. A perspectiva é que ocorra morte embrionária no início da gestação ou que o feto em desvantagem morra durante a segunda metade da gestação, dando início ao abortamento (Ginther, 1992; Allen e Stewart, 2001).

A placenta microcoteledonária e o endométrio inteiramente funcionais são pré-requisitos essenciais para uma gestação normal na égua e produção de um feto sadio e bem desenvolvido (Ginther, 1992; Allen e Stewart, 2001; Wilsher e Allen, 2003).

Considerações finais

Por apresentar características tão distintas, o equino tem sido uma espécie modelo na embriologia. Ainda não está completamente esclarecida a origem de algumas peculiaridades no desenvolvimento embrionário equino, mas sabe-se que do início ao fim da gestação, a égua contrasta com as outras espécies animais domésticas em muitos aspectos estruturais e funcionais, que se combinam para fornecer nutrição suficiente para o crescimento e desenvolvimento do embrião.

Com o uso cada vez maior das técnicas de reprodução assistida, torna-se de grande importância o

conhecimento das fases do desenvolvimento embrionário e da fisiologia e endocrinologia da gestação, para com isso, diminuir problemas como a perda precoce da gestação e otimizar os resultados das biotecnologias da reprodução equina.

Bibliografia

- Abd-Elnaeim MMM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR (2006). Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*, 27: 1103-1113.
- Adams AP, Antczak DF (2001). Ectopic Transplantation of Equine Invasive Trophoblast. *Biology of Reproduction*, 64: 753-763.
- Allen WR (2000). The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. In: American Association of Equine Practitioners. *Proceedings...*, 46: 338-354.
- Allen WR (2001). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Journals of Reproduction and Fertility*, 121: 513-527.
- Allen WR, Stewart F (2001). Equine placentation. *Reproduction, Fertility and Development*, 13: 623-634.
- Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rosedale PD, Fowden AL (2002a). Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*, 123: 445-453.
- Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Ousey J, Fowden A (2002b). The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *Journal of Endocrinology*, 172: 237-246.
- Arar S, Chan KH, Quinn BA, Waelchli RO, Hayes MA, Betteridge KJ, Monteiro MA (2007). Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. *Carbohydrate Research*, 342: 1110-1115.
- Betteridge KJ (2000). Comparative aspects of equine embryonic development. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 691-702.
- Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R (1982). Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy*, 135: 191-209.
- Chu JWK, Sharom FJ, Oriol JG, Betteridge KJ, Cleaver BD, Sharp DC (1997). Biochemical Changes in the Equine Capsule Following Prostaglandin-Induced Pregnancy Failure. *Molecular Reproduction and Development*, 46: 286-295.
- Crossett B, Suire S, Herrler A, Allen WR, Stewart F (1998). Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biology of Reproduction*, 59: 483-490.
- de Mestre AM, Bacon SJ, Costa CC, Leadbeater JC, Noronha LE, Stewart F, Antczak DF (2008). Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles. *Placenta*, 29: 158-169.
- Ellenberger C, Wilsher S, Allen WR, Hoffmann C, Kolling M, Bazer FW, Klug J, Schoon D, Schoon HA (2008). Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's

- uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology* 70: 746-757.
- Gastal MO, Gastal EL, Torres CAA, Ginther OJ (1998). Effect of PGE₂ on Uterine Contractility and Tone in Mares. *Theriogenology*, 50: 989-999.
- Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F (1999). Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *Journals of Reproduction and Fertility*, 117: 143-152.
- Ginther OJ (1983). Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, 19: 603-611.
- Ginther OJ (1992). Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2^a Ed. Equiservices: Madison, Wisconsin, 642 p.
- Hafez B, Hafez ESE (2004). *Reprodução Animal*. 7^a Ed. Monole, São Paulo, 513 p.
- Herrler A, Beier HM (2000). Early Embryonic Coats: Morphology, Function, Practical Applications. *Cells Tissues Organs*, 166: 233-246.
- Leith GS, Ginther OJ (1984). Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, 22: 401-408.
- Lunn P, Vagnoni KE, Ginther OJ (1997). The equine immune response to endometrial cups. *Journal of Reproductive Immunology*, 34: 203-216.
- Oriol JG, Sharom FJ, Betteridge KJ (1993). Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *J Reprod Fertil*, 99: 653-664.
- Quinn BA, Hayes MA, Waelchli RO, Kennedy MW, Betteridge KJ (2007). Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. *Reproduction*, 134: 161-170.
- Raeside JI, Christie HL, Renaud RL, Waelchli RO, Betteridge KJ (2002). Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium in early pregnancy. *Theriogenology*, 58: 817-820.
- Raeside JI, Christie HL, Renaud RL, Waelchli RO, Betteridge KJ (2004). Estrogen Metabolism in the Equine Conceptus and Endometrium During Early Pregnancy in Relation to Estrogen Concentrations in Yolk-Sac Fluid. *Biology of Reproduction*, 71: 1120-1127.
- Sharp DC (2000). The early fetal life of the equine conceptus. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 679-689.
- Stewart F, Charleston B, Crossett B, Barker PJ, Allen WR (1995). A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 150: 65-70.
- Stout TAE, Allen WR (2001). Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Journals of Reproduction and Fertility*, 121: 771-775.
- Stout TAE, Allen WR (2002). Prostaglandin E₂ and F₂ production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Society for Reproduction and Fertility*, 123: 261-268.
- Stout TAE, Meadows S, Allen WR (2005). Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Animal Reproduction Science*, 87: 269-281.
- Wilsher S, Allen WR (2003). The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 35: 476-483.
- Wooding FB, Morgan G, Fowden AL, Allen WR (2001). A Structural and Immunological Study of Chorionic Gonadotrophin Production by Equine Trophoblast Girdle and Cup Cells. *Placenta*, 22: 749-767.