



## O endométrio no transporte espermático e durante a gestação precoce

*The endometrium in the sperm transport and during early gestation*

**Rodrigo Costa Mattos<sup>1,4</sup>, Sandra Mara Fiala-Rechsteiner<sup>2</sup>, Maria Noel Martinez<sup>3</sup>, Giovanni Casanova Camozzato<sup>1</sup>, Andreza Morais de Souza<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Zimmermann Winter<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>HISTOREP, Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas, Brasil.

<sup>3</sup>Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup>Correspondência: rcmattos@ufrgs.br

### Resumo

Este trabalho objetivou revisar as ações do endométrio durante o transporte espermático após a cobertura ou inseminação artificial e suas alterações após a entrada do embrião no útero até a formação da placenta.

**Palavras-chave:** equino, mobilidade embrionária, placentação, sêmen.

### Abstract

*This paper aimed to review the endometrial actions during the sperm transport after breeding or artificial insemination and the changes occurred after the embryo enter in the uterus until placenta formation.*

**Keywords:** embryonic mobility, equine, placentation, semen.

### Introdução

Nos equinos os espermatozoides são depositados diretamente no interior do útero durante a cobertura ou inseminação artificial (IA). Neste momento, as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo os espermatozoides, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (Troedsson, 1997). O útero reage rapidamente à presença do sêmen através de um aporte de neutrófilos, que são identificados no útero 30 minutos após a cobertura (Kotilainen et al., 1994).

A reação inflamatória é dependente da concentração espermática. Concentrações mais elevadas induzem a uma maior reação quimiotática, pela ativação do sistema complemento ou outros mediadores, resultando numa fagocitose do esperma e das bactérias mais célere e eficiente. Esta rápida destruição do material estranho resulta num processo inflamatório de mais curta duração que os observados nas inflamações causadas por menor número de espermatozoides ou concentração mais baixa (Fiala et al., 2007). Da mesma forma, observando o número de neutrófilos existentes nos *stratum compactum* e *spongiosum* verifica-se que quanto menor a agressão ao endométrio maior é a inflamação residual (Nikolakopoulos e Watson, 2000). Esta resposta objetiva a eliminação do excesso de espermatozoides e daqueles defeituosos ou mortos (Troedsson et al., 1998). Por outro lado, a fibrose endometrial não está associada ao aumento do número de PMNs no endométrio após a IA (Fiala et al., 2007).

### Transporte espermático

As células espermáticas são transportadas, pelas contrações uterinas, para reservatórios no interior do trato reprodutivo da fêmea, locais que permitem o acúmulo e manutenção de uma população viável de espermatozoides. Um contato maior destas células com o epitélio luminal desses reservatórios é fundamental para a manutenção de sua viabilidade e função (Smith e Yanagimachi, 1990). Na égua foram sugeridos como reservatórios espermáticos o istmo do oviduto (Thomas et al., 1994) a junção útero-tubárica (Scott et al., 2002) e as glândulas endometriais (Fiala et al., 2007; Fig. 1). Alguns espermatozoides atingem o oviduto 30 min após a IA (Fiala et al., 2008), mas o tempo da primeira aparição de células espermáticas no oviduto ainda não foi registrado.

O número de espermatozoides que chega ao oviduto após a IA com sêmen fresco não se altera entre os 30 min e as 24 h. Da mesma forma, o percentual de éguas em que foi detectada a presença de células espermáticas nos ovidutos não varia entre os 30 min e as 24 h da IA (Fiala et al., 2010; Fig. 2). Entretanto, observa-se uma correlação negativa entre o tempo da IA e o número de éguas apresentando espermatozoides no lúmen uterino ( $r = -0.955$ ) e no interior das glândulas endometriais ( $r = -0.914$ ) e uma diminuição do número de células espermáticas no lúmen uterino e nas glândulas endometriais 4 h após a IA. Isto provavelmente se deve à

eliminação e ao decréscimo de suprimento de novas células espermáticas (Fiala et al., 2010).

O número de espermatozoides observados nos cornos uterinos e nas tubas ipsi e contralateral ao folículo dominante são similares nas primeiras duas horas após a IA. Estes dados demonstram que provavelmente a primeira onda de transporte espermático ocorre imediatamente após a deposição seminal auxiliada por contrações do miométrio associadas à IA (Katila et al., 2000). As células espermáticas aparentam serem dirigidas de forma independente sem uma orientação hormonal ou efeito termotático (Bahat e Eisenbach, 2006). É possível que esta onda seja responsável pela população espermática nos reservatórios além da presença dos primeiros espermatozoides nos ovidutos (Fiala et al., 2007).



Figura 1. Células espermáticas no interior das glândulas endometriais 1 h após a inseminação artificial.

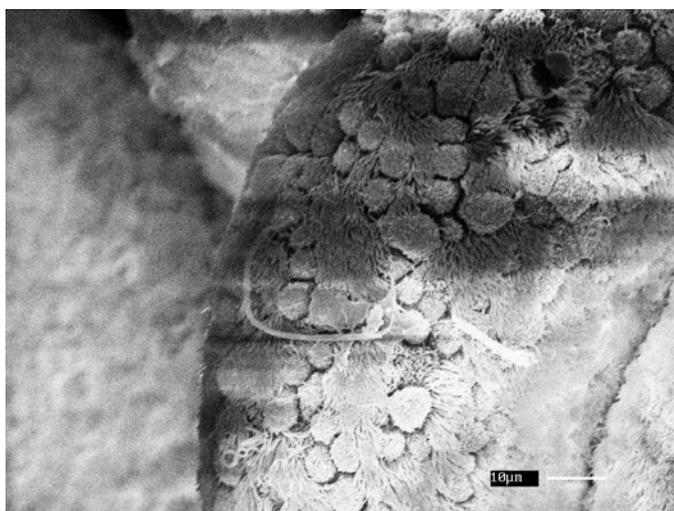


Figura 2. Espermatozoide no interior do oviduto. Microscopia eletrônica de varredura 1500X.

### Embrião no oviduto

Após a ocorrência da fertilização no oviduto o jovem embrião indica sua presença, interrompe o ciclo estral e mantém a gestação, num processo conhecido como “Reconhecimento Materno da Prenhez” (RMP) (Short, 1969). A diferença dos ruminantes e dos suínos em relação aos equinos é que estes são uma das poucas espécies domésticas na qual o sinal do RMP derivado do embrião ainda não foi identificado (Klohonz et al., 2013).

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

Dentre as características fisiológicas incomuns da prenhez nos equídeos, os oócitos fertilizados e não fertilizados são diferentemente transportados pelo oviduto e só os primeiros atravessam a união istmo-ampola (Flood et al., 1979). O próprio embrião sintetiza grandes quantidades de prostaglandina E2 (PGE2) no dia 5 pós-

concepção, para estimular o relaxamento e a contração do oviduto e passar para o útero (em torno de 24 h depois; Weber et al., 1991, 1992, 1995). Portanto, a composição e a qualidade do meio ambiente uterino são críticos para o contínuo suporte e desenvolvimento do conceito a partir do 6º dia pós-ovulação (Kenney, 1978; Ginther, 1992; Ball, 1993; Crosset et al., 1996).

### Da entrada no útero à fixação

O embrião equino entra no útero como blastocisto 5 a 6 dias após a ovulação (Betteridge et al., 1982) e se movimenta livremente pelo lúmen endometrial até o dia 15 a 16 pós-fertilização quando se fixa na base de um dos cornos uterinos (Ginther, 1983; Gastal et al., 1996). Um aumento do fluxo sanguíneo endometrial é associado com a presença do conceito durante a fase de mobilidade da prenhez precoce da égua (Silva et al., 2005; Silva e Ginther, 2006). O endométrio muda rapidamente, pois a composição e a qualidade do meio ambiente uterino são pontos críticos para o contínuo suporte e desenvolvimento do conceito (Crosset et al., 1996). Desde sua entrada no útero o embrião livre depende do ambiente uterino para a sua sobrevivência (Guillomot et al., 1988) sendo mantido unicamente pelas secreções que se acumulam no lúmen uterino, um fenômeno conhecido como nutrição histotrófica (Ashworth, 1995).

Diversas mudanças ocorrem no endométrio com a entrada do embrião. A partir do 7º dia de gestação ocorre uma redução das células ciliares em relação a éguas no 7º dia do diestro e seu número diminui constantemente no transcorrer dos dias. Na égua gestante com sete dias há presença de células secretórias microvilosadas ingurgitadas e é possível observar presença de material histotrófico encobrindo algumas áreas do epitélio. A quantidade de secreção aumenta consideravelmente, deixando as células ciliares submersas. Algumas células secretórias alongam-se distintamente. No 13º dia de gestação, ocorre um aumento das aberturas glandulares e o histotrofo dispõe-se difusamente pelo epitélio. As células ciliares são observadas, geralmente, somente nas aberturas das glândulas (Camozzato et al., 2015; Fig. 3).

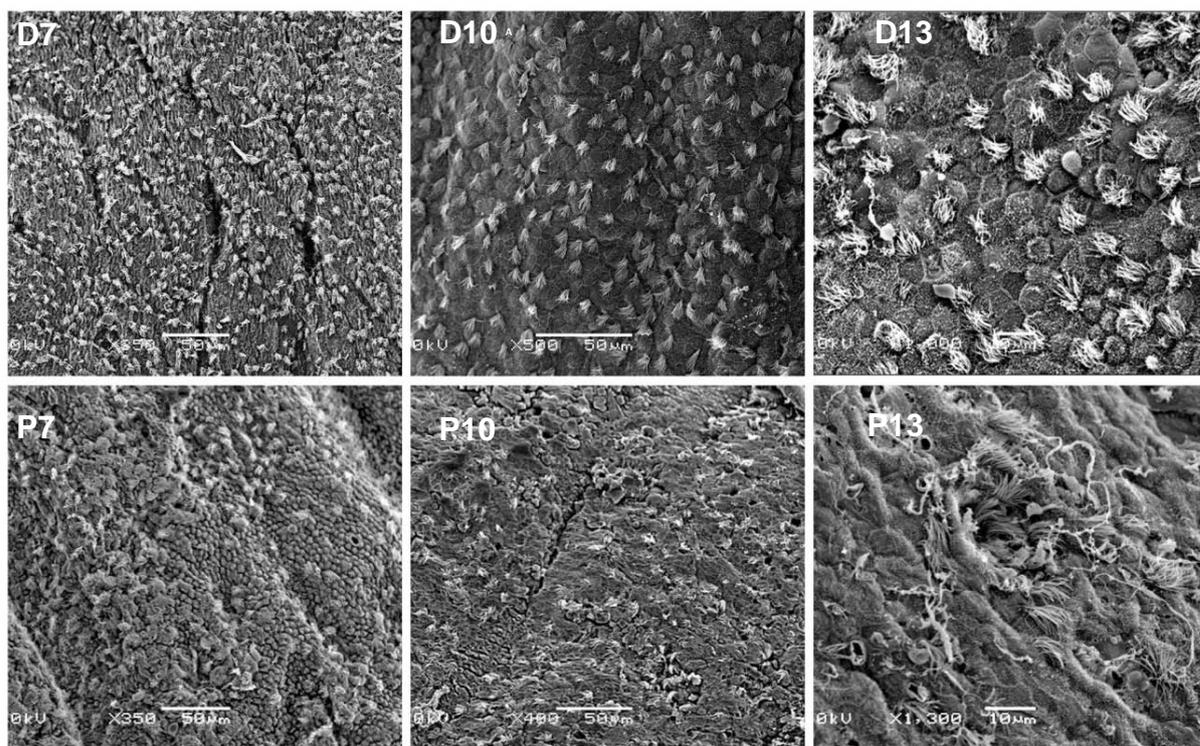


Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do endométrio de éguas em diestro (D7, D10 e D13) e éguas prenhes (P7, P10 e P13). (D7) Eletromicrografia (x350) do epitélio luminal com grande quantidade de células ciliares. (D10) Eletromicrografia (x500) do endométrio com células ciliares e secretórias planas. (D13) Eletromicrografia (x1000) do endométrio com células ciliares e células epiteliais secretórias planas e protusas. (P7) Eletromicrografia (x350) do endométrio com células ciliares, células secretórias protusas e secreção histotrófica. (P10) Eletromicrografia (x400) do endométrio com células ciliares cobertas por grande quantidade de histotrofo. (P13) Eletromicrografia (x1300) de glândula endometrial cercado por células ciliares e grande quantidade de histotrofo.

No 7º dia de gestação o epitélio glandular torna-se mais alto e as glândulas endometriais aumentam o seu diâmetro. No 10º dia há um aumento da secreção nas glândulas endometriais e a partir do 13º sua luz

aumenta (dados não publicados), demonstrando uma rápida adaptação do útero à nova realidade.

O endométrio na região dorsal à vesícula embrionária exibe uma invasão aos 21 dias de prenhez, consistindo num aumento da área ocupada pelas glândulas endometriais. Estudos utilizando ultrassonografia modo Doppler detectaram mudanças vasculares significativas no útero e no embrião de éguas (Silva et al., 2011).

### Da fixação à placentação

Após a fixação a característica mais marcante de transformação endometrial ou adaptação à prenhez, é o desaparecimento quase total das células ciliadas na superfície epitelial no endométrio. Além disso, a capacidade secretória das células microvilosas sofre alterações com a idade gestacional. Células secretoras ingurgitadas e protrusoras são a maioria da população epitelial, onde se acumula histotrofo, e mostram erosões em sua superfície, provavelmente pela secreção apócrinas de vesículas. A superfície epitelial também mostra pleomorfismo e epitélio pseudoestratificado como resultado de hiperplasia celular intensa. Isto é acompanhado por espessamento das glândulas endometriais a partir do 21º dia de gestação, diminuindo após o 36º dia. Linfócitos, provavelmente células Natural Killers uterinas, são encontrados no epitélio luminal do endométrio desde o 21º dia de gestação, nos cornos gravídicos e não gravídicos. A formação de septos foi evidenciada no epitélio luminal, com sulcos formados desde os 35 dias, tornando-se mais profundos a partir dos 42 dias de gestação. Esta contínua evolução e adaptação ocorrem principalmente no corno gravídico, acompanhado em menor intensidade no corno não gravídico (Winter et al., 2014; Fig. 4 e 5).

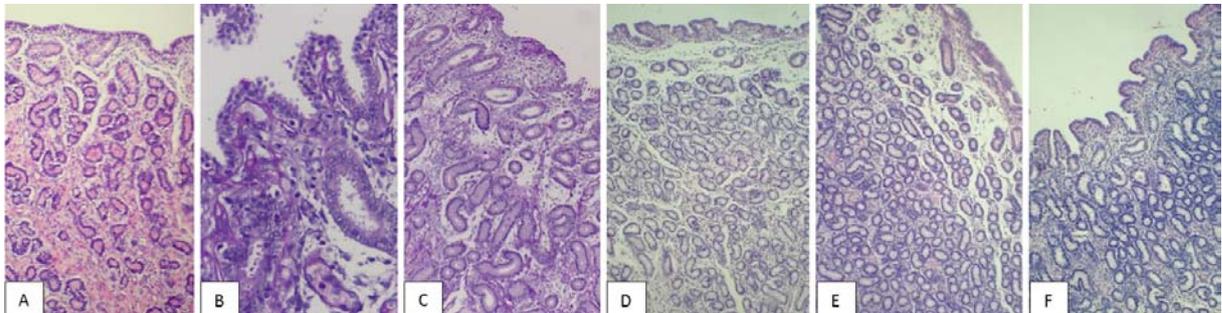


Figura 4. Histologia de endométrio no diestro (A) e de cornos gravídicos durante a gestação aos 21 (B), 25 (C), 30 (D), 35 (E) e 42 (F) dias de gestação (todas as imagens em 100X com exceção do 21º dia que se encontra em 400X).

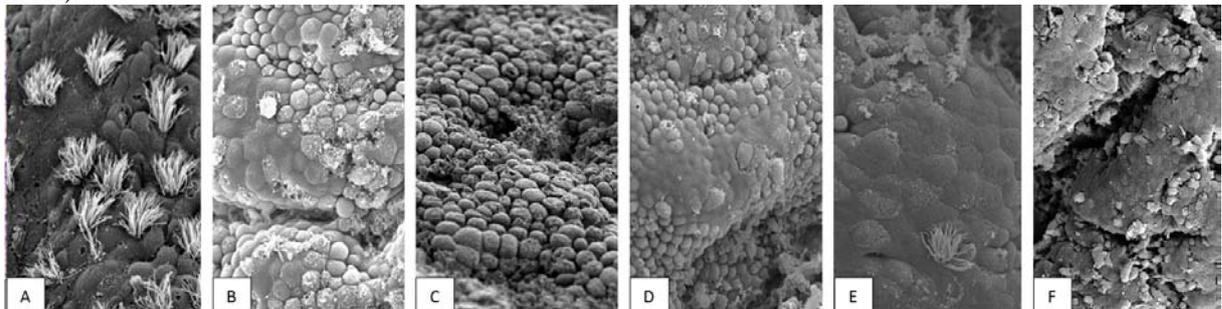


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de endométrio no diestro (A) e de cornos gravídicos durante a gestação aos 21 (B), 25 (C), 30 (D), 35 (E) e 42 (F) dias de gestação.

Em torno do 36º dia de gestação, as células do trofoblasto do anel coriônico das vesículas embrionárias invadem ativamente o endométrio (Allen e Moor, 1972; Allen et al., 1973) promovendo a implantação embrionária. A partir de então inicia a formação dos cálices endometriais, exclusivo dos equídeos, e persiste do 40º ao 150º dia de gestação (Antczak et al., 2013). A fixação da placenta ao útero, a placentação propriamente dita, é um processo de desenvolvimento gradual do complexo microcotilédones/microcarúnculas entre os dias 40 e 150 da prenhez (Samuel et al., 1975; Ginther, 1992). Todos os processos acima mencionados ocorrem durante um longo período em éguas, características que tornam o equídeo excelente modelo experimental *in vivo* para estudar o desenvolvimento do embrião-feto, mudanças fisiológicas maternas e interferências durante a gestação precoce.

Em resumo, é razoável afirmar que o endométrio, no início da gestação, devido à influência da progesterona e fatores de crescimento - vasculogênicos, mitogênicos e motogênicos, pela resistência mecânica das contrações do miométrio e pelo contato físico das vesículas embrionárias, estimulam alterações na estrutura e na arquitetura endometrial.



## Referências

- Allen WR.** Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim Reprod*, v.2, p.209-223, 2005.
- Allen WR, Hamilton DW, Moor RM.** The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anat Rec*, v.177, p.485-501, 1973.
- Allen WR, Moor RM.** The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil*, v.29, p.313-316, 1972.
- Antczak DF, De Mestre AM, Wilsher S, Allen WR.** The equine endometrial cup reaction: a fetomaternal signal of significance. *Annu Rev Anim Biosci*, 1:419-442, 2013.
- Ashworth CJ.** Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci*, v.44, p.99-105, 1995.
- Bahat A, Eisenbach M.** Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol*, v.27, p.115-119, 2006.
- Ball BA.** Embryonic death in mares. In: McKinnon AL, Voss JL (Ed.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p.517-531.
- Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R.** Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat*, v.135, p.191-209, 1982.
- Camozzato GC, Martinez MN, Bastos HBA, Cazales N, Jobim MIM, Meikle A, Gregory RM, Mattos RC.** Reconhecimento materno da prenhez em éguas: características morfológicas do endométrio. In: Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal, 1, 2015, Buenos Aires. Buenos Aires: SLRA, 2015.
- Crossett B, Allen WR, Stewart F.** A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem J*, v.320, p.137-143, 1996.
- Fiala SM, Cruz LA, Rodrigues RF, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC.** Sperm cells in the reproductive tract of the mare: where we can find them? *Pferdeheilkunde*, v.26, p.19-21, 2010.
- Fiala SM, Jobim MIM, Katila T, Gregory RM, Mattos RC.** Sperm distribution in the oviduct and uterus on mares within two hours after artificial insemination. *Pferdeheilkunde*, v.24, p.96-98, 2008.
- Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Gregory RM, Mattos RC.** Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, v.67, p.556-562, 2007.
- Flood PF, Jong A, Betteridge KJ.** The location of eggs retained in the oviducts of mares. *J Reprod Fertil*, v.57, p.291-294, 1979.
- Gastal MO, Gastal EL, Kot K, Ginther OJ.** Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. *Theriogenology*, v.46, p.1171-1180, 1996.
- Ginther OJ (Ed.).** Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2nd ed. Madison, WI: Equiservices, 1992.
- Ginther OJ.** Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, v.19, p.603-611, 1983.
- Guillomot M, Renaud P, Charpigny G, Martal J.** Embryo-uterine interaction during early stages of pregnancy in domestic mammals. *Reprod Nutr Dev*, v.28, p.1629-1648, 1988.
- Katila T, Sankari S, Mäkelä O.** Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *J Reprod Fertil Suppl*, v.56, p.571-578, 2000.
- Kenney RM.** Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc*, v.17, p.241-262, 1978.
- Klohonatz KK, Bouma GJ, Bruenmer JE.** Equine endometrial gene expression during maternal recognition of pregnancy. *J Equine Vet Sci*, 33:372, 2013.
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T.** Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, v.41, p.629-636, 1994.
- Merkel MC.** Microarray analysis of the equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. 2011. Inaugural Dissertation - Ludwig-Maximilians-University, Munich, 2011.
- Nikolakopoulos E, Watson ED.** Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine Vet J*, v.32, p.164-166, 2000.
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH.** Ultrastructural development of the equine placenta. *J Reprod Fertil Suppl*, v.23, p.575-578, 1975.
- Scott MA, Varner DD, Liu IKM, Enders AC.** Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy. *Theriogenology*, v.58, p.639-642, 2002.
- Short RV.** Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M (Ed.). *Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy*. London: Churchill, 1969. p.2-26.
- 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*, v.72, p.755-761, 2005.
- Silva LA, Ginther OJ.** An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. *Biol Reprod*, v.74, p.337-343, 2006.
- Silva LA, Klein C, Ealy AD, Sharp DC.** Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system



immunolocalization and gene expression study. *Reproduction*, v.142, p.593-603, 2011.

**Smith TT, Yanagimachi R.** The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod*, v.42, p.450-457, 1990.

**Thomas PG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Southwood L.** A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biol Reprod*, v.51, p.303-309, 1994.

**Troedsson MHT.** Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, v.13, p.516-520, 1997.

**Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG.** Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*, v.50:807-818, 1998.

**Weber JA, Freenan DA, Vanderwall DK, Woods GL.** Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol Reprod*, v.45, p.544-546, 1991.

**Weber JA, Woods GL, Freenan DA, Vanderwall DK.** Prostaglandin E2-specific binding to the equine oviduct. *Prostaglandins*, v.43, p.61-65, 1992.

**Weber JA, Woods GL, Lichtenwalner AB.** Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. *Biol Reprod Mono Ser*, 1:125-130, 1995.

**Winter G, Souza A, Cazales N, Miglino MA, Mattos RC.** Morphological changes during post fixation and peri-implantation period in equine endometrium. *Placenta*, v.35, p.A14, 2014.

---