

FRANCIELI PEREIRA CARNEIRO

**Análise estereológica e ultraestrutural da membrana
corioalantóideana de éguas gestantes de clones equinos**

São Paulo

2022

FRANCIELI PEREIRA CARNEIRO

Análise estereológica e ultraestrutural da membrana corioalantóideana de éguas gestantes de clones equinos

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes

São Paulo

2022

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4252
FMVZ

Carneiro, Francieli Pereira
Análise estereológica e ultraestrutural da membrana corioalantóideana de éguas gestantes de clones equinos / Francieli Pereira Carneiro. – 2022.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes.

1. Clones equinos. 2. Membrana corioalantóideana. 3. Histologia. 4. Estereologia. 5. Ultraestruturas. I. Título.

Certificado da Comissão de Ética (obrigatório)



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DO MACRO AOS GENES DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE ÉGUAS GESTANTES DE CLONES EQUINOS", protocolada sob o CEUA nº 3477230720 (ID 008270), sob a responsabilidade de **Cláudia Barbosa Fernandes** e equipe; *Francieli Pereira Carneiro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/08/2020.

We certify that the proposal "FROM MACRO TO GENES OF THE CHORIOALANTHOID MEMBRANE OF PREGNANT MARES OF EQUINE CLONES", utilizing 20 Equines (20 females), protocol number CEUA 3477230720 (ID 008270), under the responsibility of **Cláudia Barbosa Fernandes** and team; *Francieli Pereira Carneiro* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/12/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

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

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **5 a 15 anos**

N: **20**

Linhagem: **Mangalarga**

Peso: **350 a 550 kg**

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

São Paulo, 05 de setembro de 2022

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARNEIRO, FRANCIELI PEREIRA

Título: **Análise estereológica e ultraestrutural da membrana corioalantóideana de éguas gestantes de clones equinos**

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

Data: 14/10/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. Claudia Barbosa Fernandes

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Profa. Dra. Mariana Veras Matera

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Profa. Dra. Yatta Linhares Boakari

Instituição: University of Kentucky

Julgamento: _____

*À minha amada mamãe, pelas outras 3 vidas que me proporcionaste – Amor e
cuidado ao tocar Almas;
Ao meu amado papai (in memoriam) – Força e coragem para enfrentar os desafios
da Vida;
À toda a minha adorada família;
Aos animais!*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos Mestres

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

*Ao **Médico Veterinário Tiago Augusto Ferrari**, por me apresentar a medicina veterinária, em especial a reprodução equina, pelos inúmeros estágios e aprendizado. Você fez toda a diferença em minha trajetória profissional, serei eternamente grata por tudo que fez por mim.*

*À **Profa. Dra. Sandra Helena Gabaldi Wolf**, por todos os ensinamentos e oportunidades durante a graduação. A sua alegria e competência foram farol para a minha caminhada até aqui. Obrigada pelas melhores aulas.*

*Ao **Prof. Dr. Heitor Flávio Ferrari**, por abrir as portas para a carreira científica. Agradeço imensamente por me mostrar esse caminho que faço dele agora por diante, o meu Caminho.*

*Ao **Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes**, por ter a paciência e cuidado de sentar comigo lado a lado, depois de uma importante conversa sobre a vida e ao final me perguntar: “- E aí, Japonesa, o que você quer fazer profissionalmente?”. Esse foi, sem dúvidas, um dos momentos mais marcantes da minha vida profissional onde a sua pergunta, professor, me levou a várias introspecções e me ajudou a entender o que eu queria fazer e ser. Jamais irei esquecer suas orientações no nosso último telefonema, ensinamentos que guardarei para sempre. Obrigada pela enorme contribuição para a reprodução e obstetrícia animal.*

*À **Profa. Dra. Cláudia Barbosa Fernandes**, pelos maiores ensinamentos durante toda a pós-graduação. A senhora por incontáveis vezes me pegou pela mão e me ajudou a trilhar os caminhos. Amparou e acreditou em mim naqueles momentos onde nem eu acreditava. Gostaria que soubesse a grande mulher que é, desde as maravilhosas aulas, às conversas amigáveis que tivemos no sofá amarelo da sua sala. Sou grata de todo o meu coração pelas oportunidades nesta pesquisa, parcerias com empresa e haras, do capítulo de Distocias e Emergências Obstétricas que escrevemos juntas, cursos, palestras, presentes... Você, Cláudia, é luz em todos os âmbitos.*

Agradecimentos Especiais

“Nós nos tornamos nós mesmos através dos outros.”

Lev Vygotsky

*Ao destino pela união de nossas almas no momento mais assertivo de nossas vidas, **Bruno!** Agradeço pela nossa segunda chance de existência, e comemoraremos com muita alegria por muitos anos a nossa nova data de aniversário comum (17/07). Amor - infinito e além!*

*À Amiga de todos os tempos **Mayumi**, agora estando do outro lado do mundo mas com toda a proximidade de sempre, agradeço as 3 décadas de amizade, ao sorrir junto com o meu contentamento e ao segurar a minha mão nos momentos de fragilidade. Você é o melhor presente que o universo poderia me proporcionar.*

*Ao meu Amigo **Webster** por ser essa pessoa tão especial em minha vida durante todos esses anos. Me lembro do dia do meu acidente você abrindo a porta do quarto do hospital, vendo eu e o Bruno na maca e carinhosamente dizendo: “- Eu vou matar vocês!” Sempre sabendo exatamente o que dizer.*

*Às grandes Amigas **Carla** e **Vitória** pelas videoconferências, parcerias, ajuda nos mais diversos temas, conselhos, risadas e por nos reunir no meu aniversário. Levo vocês no meu coração até o fim.*

Ao **Prof. Dr. Marcilio Nichi** por todo o carinho e atenção dedicado à nós seus alunos. As vezes faltam palavras para expressar a intensidade do olhar, mas fica aqui uma tentativa: Meu muito obrigada ao senhor, Professor!

Ao **Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe (Zitinho)**. Uma vez perguntaram para Michel de Montaigne porque gostava tanto do Étienne de La Boétie e ele respondeu: “- Porque era ele. Porque era eu.” Não encontrei outras palavras para expressar toda a complexidade em tê-lo como amigo: Porque é o Wata. Porque sou eu.

Ao **Prof. Dr. Marcílio Felix** pelas oportunidades de ministrar as primeiras aulas e palestras. Obrigada por me incentivar a sempre melhorar.

Ao Pessoal do **Edifício Griffes**, em especial ao **Sr. Affonso, Sr. Jorge, Sr. Arlindo, Marquison, Raimundo, Sr. Nonato e Mari**, agradeço todo o cuidado que sempre tiveram comigo.

Às Amigas **Bárbara e Naomi**, pelas alegrias e tristezas vividas na pós-graduação. Agradeço em especial à **Barbarete** por compartilhar momentos de aventuras dentro e fora do departamento - Parceira de experimentos, de plantões, de GPS erradíssimos em meio às nossas andanças, de Negroni e de Vila 567.

À Amiga **Harumi** – Coração da pós-graduação no departamento de Reprodução Animal (FMVZ/USP). Nossas conversas sempre me fizeram ver com mais nitidez o horizonte. Agradeço a oportunidade da amizade construída.

Ao Amigo **Fernando**, obrigada por todos os momentos de descontração que fizeram meus dias mais leves e sofisticados. Fica aqui meus sinceros agradecimentos e pela amizade adquirida.

Agradecimentos

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”

Paulo Freire

*À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, pela realização deste curso de Pós-graduação.*

*À **CAPES** pela bolsa de estudos concedida e **FAPESP** pelo custeio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.*

*Aos integrantes do **Laboratório de Estudos da Prenhez e Periparto em Equídeos** – **LEPPE**, a qual tenho orgulho de pertencer, por todo o conhecimento adquirido nos diversos experimentos.*

*À **Dra. Maria Augusta Alonso – Guta Alonso** e **InVitro Equinos** na qualidade da **Dra. Perla Dagher Cassoli Fleury** pela parceria neste e em outros ilustras projetos de pesquisa.*

*À **Profa. Dra. Mariana Matera Veras** pelo auxílio no desbravamento do munda da estereologia e a gentileza das fotografias das lâminas histológicas.*

Ao Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto e à Dra. Rose Eli Grassi Rici pela cortês colaboração na execução da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos colegas de mesma safra, funcionários e professores do Departamento de Reprodução Animal, em especial ao Hiroshito, Alvinho, Ken, Fábio, Rafa, Bob, Lu, Bru, Laís, Guilherme e Henrique, meus sinceros agradecimentos por todos os momentos compartilhados nesses anos.

*À todas as **estagiárias** pela ajuda na coleta do material biológico, vocês foram Jóia!*

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Sarah Westphal

RESUMO

CARNEIRO, F. P. **Análise estereológica e ultraestrutural da membrana corioalantóideana de éguas gestantes de clones equinos**. 2022. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A clonagem é uma das mais recentes biotecnologias reprodutivas utilizada na indústria de equídeos, com principal aplicabilidade em animais com alto potencial genético. A técnica apresenta importantes benefícios, entre eles a criopreservação de células ou tecidos de animais inférteis ou castrados, distribuição de genéticas superiores, recriação de animais idosos comercialmente/esportivamente relevantes e animais mortos precocemente. O procedimento mais utilizado para a clonagem é a Transferência Nuclear de Células Somáticas e embora progressos significativos tenham sido conquistados, muitos aspectos precisam ser esclarecidos para aumentar a eficácia da técnica e ampliar as taxas de produção. Estudos demonstram uma diversidade de anormalidades em placentas provenientes de clones equinos, tais como placentite, edema placentário e ingurgitamento de vasos alantóides. Apesar da relevância desta biotécnica, pouco se sabe sobre os fundamentos das alterações placentárias, bem como sobre a estruturação celular e tecidual de placentas de clones equinos. Dentre as técnicas de pesquisa, a estereologia é um importante instrumento utilizado em diferentes espécies para obtenção de informações tridimensionais acerca de estruturas microscópicas, onde possibilita a comparação do potencial funcional de tecidos; e a partir da caracterização morfológica ultraestrutural é possível o entendimento da organização e mecanismos celulares responsáveis pela manutenção de órgãos e viabilidade de organismos. Dessa forma, esse estudo avaliou a composição, estrutural e a arquitetura de membranas corioalantoideanas a termo de gestações de produtos equinos clonados em comparação a controles. Para isso realizou a análise estereológica e ultraestrutural em 5 membranas corioalantóides de éguas gestantes de clones equinos viáveis; 5 membranas corioalantóides de éguas gestantes de clones óbitos/natimortos e 5 membranas corioalantóides de éguas controle gestantes resultantes de inseminação artificial e transferência embrionária.

Palavras-chave: Clones equinos. Membrana corioalantóideana. Histologia. Estereologia. Ultraestruturas.

ABSTRACT

CARNEIRO, F. P. **Stereological and ultrastructural analysis of the chorioallantoic membrane of pregnant mares from equine clones.** 2022. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Cloning is one of the most recent reproductive biotechnologies used in the equine industry, with main applicability in animals with high genetic potential. The technique presents important benefits, among them the cryopreservation of cells or tissues from infertile or castrated animals, distribution of superior genetics, recreation of commercially/sportingly relevant older animals and early dead animals. The most widely used procedure for cloning is Somatic Cell Nuclear Transfer and although significant progress has been made, many aspects need to be clarified to increase the effectiveness of the technique and expand production rates. Studies demonstrate a diversity of abnormalities in placentas from equine clones, such as placentitis, placental edema and allantoic vessel engorgement. Despite the relevance of this biotechnology, little is known about the fundamentals of placental abnormalities, as well as the cellular and tissue structure of placentas from equine clones. Among the research techniques, stereology is an important tool used in different species to obtain three-dimensional information about microscopic structures, where it allows the comparison of the functional potential of tissues; and from the ultrastructural morphological characterization it is possible to understand the organization and cellular mechanisms responsible for organ maintenance and organ viability. Thus, this study evaluated the composition, structure and architecture of chorioallantoid membranes at term of pregnancies of cloned equine products in comparison to controls. For this purpose, stereological and ultrastructural analysis was performed on 5 chorioallantoid membranes from pregnant mares of viable equine clones; 5 chorioallantoid membranes from pregnant mares of death/natimorph clones and 5 chorioallantoid membranes from pregnant control mares resulting from artificial insemination and embryo transfer.

Keywords: Equine clones. Chorioallantoid membrane. Histology. Stereology. Ultrastructures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da organização dos tecidos e feto na gestação equina. Desenho esquemático da interação materno-fetal por meio da estruturação corioalantóide e epitélio uterino24

ARTIGO 1

Figura 1 - Acompanhamento do parto de égua participante do experimento. Membrana corioalantóide de éguas disposta em “F”, com exposição de lado coriônico e face alantoideana35

Figura 2 - Identificação da padronização da coleta dos focos amostrais na membrana corioalantóide de éguas36

Figura 3 - Histologia do CG de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos37

Figura 4 - Histologia do CG de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos38

Figura 5 - Histologia do CP de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos39

Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura do foco amostral do CP de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos de vilos, camada do córion, mesoderma alantoideano e vascularização39

Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura do CP de éguas do grupo SCNT óbitos/ natimortos. Destruição dos vilos microcotiledonários, descamação do epitélio trofoblástico e extravasamento de sangue fetal40

Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura do CP de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos. Camada ignota recobrimdo parcialmente os vilos no grupo SCNT óbitos/ natimortos40

Anexo 1 - Painel histológico comparativo da membrana corioalantoideana de éguas gestante de Controle, SCNT viáveis, SCNT óbitos/ natimortos das regiões de corno gestante (CG), corno não gestante (CNG) e corpo do útero (CP)52

ARTIGO 2

Figura 1 - Esquema de mensuração em centímetro da membrana corioalantóideana. Identificação da padronização da coleta dos focos amostrais na membrana corioalantóide.....	59
Figura 2 - Aplicação do sistema teste sobre fotografia da membrana corioalantóideana equina, utilizando o programa Image J®.....	60
Figura 3 - Determinação da Densidade, Largura e Altura da região placentária equina, utilizando o programa Image J®.....	61
Figura 4 - Determinação da Altura da Camada do córion, Mesoderma alantoideano e Camada alantoideana de cada região placentária equina, utilizando o programa Image J®.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média \pm erro padrão com valor de p das variáveis Densidade, Altura e Largura dos microcotilédones nos grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/natimortos	65
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Volume total em cm ³ da membrana corioalantoideana no grupo Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos.....	62
Gráfico 2 - Volume total em cm ³ das regiões placentárias entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos, nos macrocompatimentos de corno gravídico (CG), corno não gravídico (CNG) e corpo do útero (CP)	63
Gráfico 3 - Volume total em % de vilos das regiões placentárias no macrocompatimento de corno gravídico (CG) entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos	63
Gráfico 4 - Volume total em % de vilos das regiões placentárias no macrocompatimento de corno não gravídico (CNG) entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos	64
Gráfico 5 - Volume total em % de vilos das regiões placentárias no macrocompatimento de corpo do útero (CP) entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos	64
Gráfico 6 - Densidade, Largura e Altura dos microcotilédones entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos	65
Gráfico 7 - Altura da camada do córion, mesoderma alanteoideano e camada alantoideana em sua totalidade, entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
	2.1 PAPEL DA PLACENTA	23
	2.2 PLACENTA <i>versus</i> CLONAGEM	27
3	ARTIGO 1.....	30
	COMPARAÇÃO HISTOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE ÉGUAS GESTANTES DE CLONES EQUINOS VIÁVEIS, ÓBITOS/ NATIMORTOS E CONTROLE	
4	ARTIGO 2.....	53
	COMPARAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE ÉGUAS GESTANTES DE CLONES EQUINOS VIÁVEIS, ÓBITOS/ NATIMORTOS E CONTROLE	
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversas biotécnicas da reprodução assistida têm sido desenvolvidas com a finalidade de aumentar a utilização do potencial reprodutivo dos mamíferos (MURUVI et al., 2005; ROSER; MEYERS-BROWN, 2019). A clonagem permite a geração de organismos geneticamente semelhantes a outros, para tanto, é utilizado o núcleo de uma célula somática ou embrionária de interesse, o qual é transferido para um ovócito previamente enucleado onde ocorre a reprogramação celular (CAMPBELL et al., 1996; OLIVERA et al., 2018).

Na indústria equídea, o procedimento mais utilizado para a clonagem é a Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT), cuja técnica foi introduzida pela primeira vez em 2003, com o nascimento de três mulas geradas a partir de fibroblastos de origem fetal (WOODS et al., 2003). No mesmo ano, Galli et al. (2003) relataram o nascimento de um potro vivo e saudável, clonado de sua própria mãe por meio de células somáticas adultas.

Apesar dos avanços significativos na execução dessa técnica reprodutiva, de acordo com pesquisa realizada por Olivera et al. (2018), a eficiência da clonagem equina derivada de fibroblastos adultos correspondeu a 41,5% de nascimentos de potros, onde praticamente a metade apresentaram alguma anormalidade fisiológica ao nascimento.

Por um lado, os benefícios básicos da transferência nuclear em equinos podemos citar: 1) Preservação genética de células ou tecidos de animais mais velhos que deixaram de ser reprodutivamente sadios ou animais castrados; 2) Preservação de material genético de animais ameaçados de extinção; 3) Melhor distribuição da genética superior em um plantel; 4) A recriação de animais com genética comercialmente relevante ou animais que morreram jovens (MASERATI; MUTTO, 2016).

Por outro lado, estudos investigativos estão sendo idealizados em placentas provenientes de gestações de clones equinos, uma vez que já foram observadas com frequência alterações como: placentite, edema placentário, espessamento do cordão umbilical correlacionado à dilatação dos vasos e presença de trombos intravasculares, edema umbilical e edema placentário associado ao ingurgitamento dos vasos alantoideanos (LAGUTINA et al., 2005; JOHNSON et al., 2010; POZOR, 2016; GAMBINI; MASERATI, 2018). De acordo com Pozor e colaboradores (2016),

alterações na estrutura e arquitetura da placenta influenciam a função e consequentemente a saúde do neonato equino clonado, corroborando para a baixa eficiência da técnica.

De acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (GUIMARÃES; MEIRELLES; FERNANDES, 2015; MEIRELLES et al., 2017), a análise morfológica e estereológica da membrana corioalantoide equina demonstrou que, placenta com menor composição estrutural, menor vascularização nos vilos placentários e menor profundidade dos microcotilédones resultaram em potros com menor vitalidade ao nascimento. Em humanos, Serov et al., (2015) e Salavati (2019) afirmam que a análise estereológica oferece uma valiosa alternativa para obtenção de informações quantitativas tridimensionais acerca de estruturas microscópicas e possibilita a comparação, durante a gestação normal, doença e tratamento experimental, do potencial funcional da placenta em diferentes espécies.

Uma vez que a placenta hígida é indispensável para o nascimento de um potro saudável - o resultado desejável de qualquer programa de reprodução, e visto que a clonagem é uma biotécnica de baixa eficiência na qual as deformidades placentárias já foram diagnosticadas como uma provável consequência da técnica e provável causa de parte ou total das alterações neonatais, entender a morfologia a nível ultraestrutural e a estereologia do tecido, bem como detectar a eficiência placentária podem nos ajudar a diagnosticar parte da ineficiência e corroborar com o aprimoramento da técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PAPEL DA PLACENTA

A placenta é um órgão transitório, formado por tecidos maternos e fetais, com a função de transportar substâncias nutritivas do organismo materno para o fetal, tal qual promover trocas metabólicas e desempenhar funções endócrinas para a manutenção da gestação. As necessidades da placentárias aumentam de acordo com a progressão gestacional, onde são acompanhadas por uma gama de modificações estruturais (LEISER; KAUFMANN, 1994; ABD-ELNAEIM et al., 2009).

O crescimento e remodelamento do endométrio e das membranas fetais são decisivos para a formação das estruturas funcionais da placenta e, esta por sua vez, é indispensável para que ocorra o desenvolvimento fetal durante todo o período gestacional (GERSTENBERG et al., 1999).

A placenta é constituída de tecidos capazes de sintetizar e secretar uma gama de hormônios, fatores de crescimento, citocinas e outros produtos bioativos indispensáveis para o desenvolvimento fetal (REGNAULT et al., 2002; WILSHER; ALLEN, 2002). Apresenta como principais funções a síntese e metabolização de hormônios e nutrientes, respiração fetal, remoção de resíduos e excretas, conferindo proteção biológica e mecânica que o feto necessita na vida intrauterina (HUGHES, 1980; ALLEN et al., 2002; ABD-ELNAEIM et al., 2009; FEDORKA et al., 2019; ROSER; MEYERS-BROWN, 2019).

Nos mamíferos o desenvolvimento placentário é um dos mecanismos multifacetados dentro de uma complexidade de órgão transitório, dado pela interação dos tecidos de origem fetal e materna, presença de uma diversidade de camadas intermediárias que se interpõem entre os leitos vasculares, estabelecendo as relações entre substâncias, tecidos e membranas fetais desde o momento de implantação do blastocisto até o evento do parto (MOSSMAN, 1987).

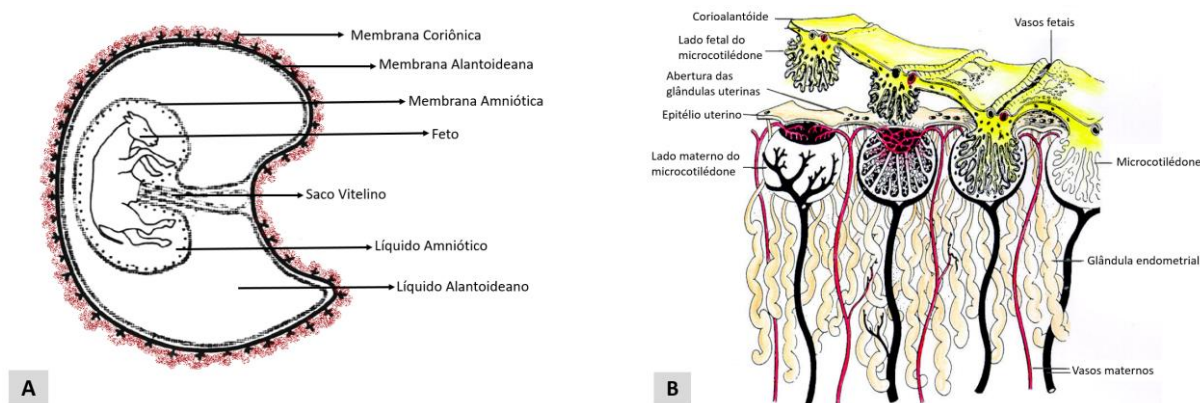
A placenta pode ser classificada pela sua forma (número e distribuição de áreas de troca de nutrientes), invasão (número de camadas de tecidos maternos que separam o sangue materno de tecidos fetais), interdigitação (grau de contato entre os tecidos fetais e maternos nas áreas de troca de nutrientes), peso da placenta em

relação ao peso neonatal e a direção dos fluxos sanguíneos materno e fetal (CAPELLINI, 2012).

Na espécie equina, a placenta é classificada como epiteliocorial - o epitélio uterino se encontra em íntimo contato com a camada externa do córion (trofotoderma; corioalantóica – formada pela fusão do mesoderma alantoideano com o mesoderma coriônico; difusa – as vilosidades coriônicas estão presentes sobre toda a superfície da membrana e; não decídua – onde não há perda dos elementos da mucosa uterina durante o parto. As vilosidades coriônicas são organizadas em complexos de tufos denominados microcotilédones, os quais recobrem a superfície coriônica e se encaixam em criptas (ou microcarúnculas) convergentes no endométrio (HUGHES, 1980; BANKS, 1992; DANTZER, 1999).

Durante o desenvolvimento dos microcotilédones, os capilares fetais iniciam um avanço em direção ao epitélio coriônico, concomitantemente os capilares maternos se aproximam do epitélio endometrial, formando um espaço no qual as vilosidades fetais possam se expandir e realizar as trocas materno-fetais necessárias (STEVEN; SAMUEL, 1975).

Figura 1 – Representação da organização dos tecidos e feto na gestação equina (A). Desenho esquemático da interação materno-fetal por meio da estruturação corioalantóide e epitélio uterino (B)



Fonte: Leiser; Kaufmann, 1994 (Adaptado). Steven; Samuel, 1975 (Adaptado).

Funcionalmente, a eficiência placentária pode ser alterada por mudanças na capacidade da placenta em suprir os nutrientes ou hormônios para mãe e/ou para o feto. A placenta transporta diversos nutrientes por difusão simples e esse transporte é mediado de maneira passiva ou ativa, cujos processos dependem das características morfológicas da placenta (SIBLEY et al., 2005).

Os processos de transportes ativos mediados por transportadores específicos são influenciados pela quantidade desses transportadores da sua atividade e localização nas membranas placentárias (PEUGNET et al., 2016; SIBLEY et al., 2005; WOODING; FOWDEN, 2006).

Neste sentido, a transferência de substâncias por meio da barreira materno-fetal depende da morfologia, fluxo sanguíneo, espessura e extensão da barreira, assim como o gradiente de concentração da substância e da eficiência de transporte da placenta (JONES; POWELL; JANSSON, 2007; WOODING; FOWDEN, 2006).

Na espécie equina, as trocas gasosas e as pequenas moléculas são difundidas por meio dos microcotilédones, já os elementos cujos pesos moleculares possuem maiores densidades são pinocitados pelo epitélio coriônico. A placenta ainda, permite o transporte de aminoácidos, vitaminas, minerais, estoca substâncias como o ferro, glicogênio e inclusive, por mecanismo de transporte ativo realiza o recrutamento da glicose – metabólito em maior quantidade de reserva para o feto equino (ASBURY & LEBLANC, 1993).

Problemas em quaisquer desses fatores e processos acima citados, podem ocasionar mudanças no padrão de desenvolvimento placentário e conseqüentemente pode interferir no crescimento fetal (SIBLEY et al., 2005; WOODING; FOWDEN, 2006).

Já foi demonstrada a relação entre as características macroscópicas da placenta com a viabilidade e a taxa de sobrevivência de potros ao nascimento. Por exemplo, atrofia/ hipoplasia das vilosidades, placentite, espessamento ou edema do corioalantoide ou do âmnio foram associados com morte fetal ou baixo peso ao nascimento de potros (ROSSDALE; OUSEY; CHAVATTE, 1997).

Alterações na estrutura e função placentária também podem refletir em retardo do crescimento intrauterino (RCIU). Estudos epidemiológicos em humanos relatam que o RCIU é uma importante causa de mortalidade e morbidade em recém-nascidos, segundo Pollack et al. (1992), assim como tem sido estabelecida uma forte ligação entre o baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de doenças na vida adulta (BARKER et al., 1990; RADEMAKER et al., 1989; BARKER, 1995, 2006; VAKIL et al., 2022).

Em humanos, a insuficiência placentária crônica leva a déficits de conexão neural e mielinização (REES; HARDING; WALKER, 2008), redução da substância cinzenta, especialmente do hipocampo e comprometimento do crescimento cortical,

com diminuição do número de células no córtex cerebral (SAMUELSEN et al., 2007). Tais modificações do crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central podem desencadear alterações neurocomportamentais nos primeiros dias de vida (TOLSA et al., 2004). Ademais, segundo Wollmann, 1998 e Meyberg et al., 2000, recém-nascidos com baixo peso, provenientes de RCIU apresentam piores desempenhos nos testes de orientação aos estímulos, respostas motoras e reflexos, além de menor tônus muscular no período neonatal imediato, expostos a alto risco de mortalidade perinatal.

Tangenciando a enfermidade em humanos, a Síndrome de Asfixia Perinatal (PAS), a princípio denominada por Rossdale (1968) de “Síndrome do Mau Ajustamento Neonatal” – também conhecida como “Encefalopatia Neonatal Equina” (ENE) ou “Potro Dummy” pode ser caracterizada por distúrbios comportamentais e disfunção nos processos de adaptação requeridos nas primeiras horas para sobrevivência de potros (MELLOR; STAFFORD, 2004; ALEMAN et al., 2019). Esta afecção é amplamente investigada, uma vez que, de acordo com uma das teorias, tem a fisiopatologia muito próxima da asfixia perinatal em humanos, na qual o prejuízo na perfusão uteroplacentária pré-parto ou durante o parto, causa a interrupção da distribuição normal do fluxo sanguíneo, resultando em danos renais, gastrintestinais, cardiopulmonares e endócrinos, assim como danos neurológicos aos neonatos (VAALA, 2003; GALVIN; COLLINS, 2004; DICKEY; LONG; HUNT, 2011; WONG et al., 2011).

Ademais, estudos epidemiológicos perinatais permitiram também o surgimento da Teoria de Barker, que propõe que as doenças cardiovasculares, metabólicas, neuroendócrinas, entre outras, surgem a partir de adaptações pelo feto frente à condições “sub-ótimas” no ambiente uterino, que corrobora com a postulação da programação fetal, segundo o qual um estímulo ou agressão em um período crítico da vida intrauterina, produz alterações no desenvolvimento com consequências permanentes a longo prazo, ou seja na vida adulta (BARKER, 2006; SECO, 2009).

Anderson et al., (2005, 2006) descreveram um modelo experimental de redução da perfusão uteroplacentária no terço final da gestação em ratas, observando que o peso da placenta, peso individual do feto, e peso da ninhada foram menores. Além disso, a geração F1, assim como a geração subsequente (F2) apresentaram hipertensão arterial persistente ao longo da vida. Estes dados chamam a atenção para o papel do fluxo sanguíneo e toda a estruturação e arquitetura uteroplacentário não

só no desenvolvimento e crescimento fetal, mas também na função cardiovascular da prole, e que essas consequências pós-natais podem ser transmitidas ao longo de gerações.

As funções fisiológicas essenciais do potro estão condicionadas à *previa* vida intrauterina, modulando o potencial genético do potro pós-nascimento (JOHNSON et al., 2009; PEUGNET et al., 2016; VAHTER et al., 2021). Essa modulação é resultado da interação do ambiente materno e do ambiente fetal, onde é constatado contribuição ativa para o estabelecimento da conformação corporal pós-natal do potro, resposta imune, metabolismo, funções tireoidiana, adrenocortical e cardiovascular (PEUGNET et al., 2016; FERNANDEZ-TWINN et al., 2019; MORALES-RUBIO et al., 2019).

Desta forma, a interação entre uma placenta saudável e um endométrio inteiramente funcional são pré-requisitos indispensáveis na espécie equina para que a gestação seja conduzida com sucesso e resulte em um produto sadio com desenvolvimento adequado (ALLEN et al., 2002; WILSHER; ALLEN, 2002).

2.2 PLACENTA *versus* CLONAGEM

A baixa viabilidade dos embriões clonados é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e pelas diversas anomalias placentárias (POZOR et al., 2016) e neonatais (FIGUEIREDO et al., 2011). O desenvolvimento da placenta em gestações de diferentes espécies de animais clonados pode resultar em falha na placentação, desenvolvimento placentário atípico e expressão anormal de genes responsáveis por todo processo da formação da membrana corioalantoide e outros anexos fetais (MIGLINO et al., 2007; MALIN et al., 2022).

Na espécie bovina, as gestações derivadas de embriões de clones são tipicamente perdidas no terço inicial. Os autores atribuem essa viabilidade deficiente à associação de várias anormalidades placentárias, como mau desenvolvimento dos placentônios, redução da vascularização nas vilosidades, hipoplasia do trofoblasto e número reduzido de células binucleadas (ARNOLD et al., 2008; CHAVATTE-PALMER et al., 2012; AKAGI et al., 2014).

Em outras espécies como ovinos e camundongos, também foi observada ineficiência placentária de embriões clonados. Na espécie ovina, o feto teve uma alta

incidência de retardo no crescimento, caracterizado pela deficiência da vascularização placentária, errônea expressão gênica na proliferação celular e apoptose (DE SOUSA et al., 2001; NI et al., 2016). Já em camundongos foi observada a placentomegalia derivada do crescimento excessivo de células espongiotrofoblásticas e aumento na diferenciação de células de glicogênio. Estes autores concluem que, diante dessas condições, houve uma perturbação na arquitetura das camadas placentárias e consequente danos em sua função (TANAKA et al., 2001).

Em éguas, alguns achados chamam à atenção na avaliação da membrana corioalantoide em gestações de clones. Por meio da utilização da ultrassonografia, foram observados edema placentário e espessamento do cordão umbilical associados a vasos umbilicais dilatados e edema umbilical, bem como dilatação cística do útero do feto clone (GAMBINI et al., 2012; POZOR et al., 2016).

Clones equinos provenientes de SCNT de fibroblastos adultos podem apresentar também insuficiência placentária, como resultado há redução do suprimento de nutrientes e disfunção na capacidade excretora e, como consequência, prejuízos no desenvolvimento fetal (OLIVERA, 2018).

A baixa eficiência do processo de clonagem animal envolve problemas tais como anomalias cromossômicas, alocação anormal do número de células no botão embrionário e trofoectoderma, formação deficiente do fuso mitótico. Os genes que são marcados (*imprinted*) de forma diferente tem sido responsabilizados similarmente pelas anormalidades embrionária e fetal (BORDIGNON; SMITH, 2008; MIGLINO, 2004; YANG et al., 2019; SRIRATTANA et al., 2022).

Como um espectro de eventos biológicos que demonstram a complexidade dos processos celulares e moleculares, a somatória destas características gradua o nível e circunstância de reprogramação epigenética do genoma doador que determinarão o sucesso ou a falha da clonagem animal (OBACK et al., 2007; GAO et al., 2010; GLANZNER et al., 2022).

Modelos matemáticos da função da placenta humana e animal têm sido propostos há muitos anos (LEISER; KAUFMANN, 1994; TALBERT; SEBIRE, 2004; MAYHEW, 2005; MAYHEW, 2006; VERAS et al., 2008; SALAZAR-PETRES et al., 2022). Dentre eles, a estereologia possibilita avaliar a relação entre a estrutura da placenta e sua função, onde concerne uma valiosa ferramenta para obtenção dos conhecimentos mais profundos sobre o funcionamento *in vivo* da placenta (MAYHEW, 2009; SEROV et al., 2015). Serov et al., (2015) utilizaram, a partir de entendimentos

a respeito da morfologia e dimensões estruturais, um modelo em geometria 3D da placenta humana que resultou em uma melhor compreensão da sinalização nervosa e das trocas de substâncias entre a gestante e o feto.

Na medicina veterinária, assim como na medicina humana, utilizam-se ferramentas de imagens e avaliações por métodos estereológicos e ultraestruturais em diversas áreas de conhecimento (GUIMARÃES; MEIRELLES; FERNANDES, 2015; TOLEDO et al., 2015; ROBLES et al., 2018; KRETSCHMER et al., 2022). Na avaliação morfométrica da placenta equina, constatou-se que a área microscópica de contato materno-fetal é afetada pelos genótipos maternos e fetais, onde o genótipo materno controla a densidade microcotiledonária, enquanto o genótipo fetal é responsável pela área placentária total (ALLEN et al., 2002). No entanto, não existem estudos com essa abordagem em placentas de gestações de embriões clones na espécie equina.

Assim, diante dos avanços da técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas, o esclarecimento da morfologia, estruturação e arquitetura do órgão responsável pela gestação (trocas gasosas, nutrição fetal, função hormonal, função excretora e função imunitária) de clones na espécie equina, é de muita valia para aumentar os índices da produção de animais viáveis (MURUVI et al., 2005; ROBLES et al., 2018).

3 ARTIGO 1

COMPARAÇÃO HISTOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDEANA DE ÉGUAS GESTANTES DE CLONES EQUINOS VIÁVEIS, ÓBITOS/ NATIMORTOS E CONTROLE

Francieli Pereira Carneiro¹, Bárbara Kolecha Costa¹, Maria Augusta Alonso²,
Perla Dagher Cassoli Fleury³, Claudia Barbosa Fernandes¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP

² Fazenda Santa Rita II – Piracaia/SP

³ InVitro Equinos – Mogi Mirim/SP

RESUMO

A clonagem por Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT) é um dos maiores progressos dentre as técnicas reprodutivas em animais e sua eficiência é dada pela capacidade em produzir organismos geneticamente equivalentes. Todavia, mesmo com a evolução da técnica nesses anos, a clonagem na espécie equina ainda é considerada ineficiente. Algumas alterações placentária são encontradas como separação do endométrio e placenta, vasos umbilicais dilatados, edema placentário, membranas alantoideanas ingurgitadas, placentite, hemorragias e tombos nos vasos umbilicais. Diferentes variações nos padrões materno e fetais podem comprometer o desenvolvimento placentário e impactar o feto, assim como deficiência na progressão fetal pode afetar a evolução placentária. Nesta perspectiva, este estudo buscou entender por meio da histologia e análise ultraestrutural, as diferenças teciduais e morfométricas em cada região placentária de corno gravídico (CG), corno não gravídico (CNG) e corpo do útero (CP) de gestações provenientes de SCNT viáveis (n=5), SCNT óbitos/ natimortos até 12 horas de nascimento (n=5) com Controle oriundas de inseminação artificial e transferência embrionária convencional (n=5). Os resultados evidenciaram que, nos grupos SCNTs com exceção do CNG do grupo SCNT viáveis, todos os focos amostrais apresentaram algum grau de infiltrado inflamatório; No grupo SCNT óbitos/ natimortos: em CG maior quantidade células colunares altas, superior quantidade de tecido conjuntivo frouxo, processo neoangiogênico; em CNG: maior quantidade de vilos aumento do número de células

colunares altas e capilares fetais; CP: maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo, intensa vascularização, aumento de células binucleadas, maior contagem de células colunares altas e capilares fetais, onde a configuração destes últimos acompanha a membrana basal do trofoblasto, destruição do epitélio trofoblasto, com exposição dos capilares fetais e extravazamento sanguíneo, fina camada de material cuja composição é incerta. No grupo SCNT viáveis, em CG: maior quantidade de células colunares altas com vilos mais alongados; CNG: desconfiguração das estruturas histológicas com presença de vacúolos e células apoptóticas, nos capilares feitas contatamos núcleos menores e mais alongados; CP: maior número de células colunares altas e espessamento das túnicas íntima, média a adventícia além de maior raio do lúmen dos vasos sanguíneos, fina camada de material desconhecido foi identificado recobrimo de forma total as vilosidades coriônicas. Importante são mais estudos para compreensão das anormalidades placentárias em clones equinos.

Palavras-chave: Clones equinos. Membrana corioalantoideana. Histologia. Ultraestruturas.

ABSTRACT

Cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) is one of the greatest advances among reproductive techniques in animals and its efficiency is given by the ability to produce genetically equivalent organisms. However, even with the evolution of the technique in these years, cloning in the equine species is still considered inefficient. Some placental alterations are found such as separation of the endometrium and placenta, dilated umbilical vessels, placental edema, engorged allantoic membranes, placentitis, hemorrhages and tumbling in the umbilical vessels. Different variations in maternal and fetal patterns can compromise placental development and impact the fetus, just as impaired fetal progression can affect placental evolution. From this perspective, this study sought to understand through histology and ultrastructural analysis, the tissue and morphometric differences in each placental region of gravid horn (CG), non gravid horn (NGC) and uterine body (PC) of pregnancies from viable SCNT (n=5), SCNT death/death within 12 hours of birth (n=5) and Control arising from artificial insemination and conventional embryo transfer (n=5). The results showed that in the SCNTs groups with the exception of the CNG of the viable SCNTs group, all sample foci presented some degree of inflammatory infiltrate; In the SCNT death/deaths group: in GC a greater amount of tall columnar cells, a greater amount of loose connective tissue, neoangiogenic process; in CNG: a greater amount of villi, increased number of tall columnar cells and fetal capillaries; CP: greater amount of loose connective tissue, intense vascularization, increased binucleated cells, higher count of high columnar cells and fetal capillaries, where the configuration of the latter accompanies the basal membrane of the trophoblast, destruction of the trophoblast epithelium, with exposure of fetal capillaries and blood leakage, thin layer of material whose composition is uncertain. In the viable SCNT group, in CG: greater amount of tall columnar cells with more elongated villi; CNG: deconfiguration of histological structures with the presence of vacuoles and apoptotic cells, in the capillaries made we found smaller and more elongated nuclei; CP: greater number of tall columnar cells and thickening of the tunica intima, media and adventitia, in addition to greater radius of the lumen of blood vessels, thin layer of unknown material was identified totally covering the chorionic villi. Further studies are important for understanding placental abnormalities in equine clones.

Keywords: Equine clones. Chorioallantoide membrane. Histology. Ultrastructures.

INTRODUÇÃO

A clonagem é um dos maiores avanços no âmbito da biotecnologia reprodutiva animal (MIGLINO, 2004), onde ela permite a geração de organismos geneticamente semelhantes a outros (CAMPBELL, 1996), que podem ser produzidos por meio de reconstrução embrionária e Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT) (CAMPBELL, 1996; LAGUTINA et al., 2005).

A eficiência da SCNT é baseada na capacidade de reprogramação e estruturação celular, para garantir um desenvolvimento placentário, embrionário e fetal adequado (NIEMANN, 2016; OLIVERA et al., 2018). Ao longo dos anos, a evolução da clonagem na espécie equina vem sendo ajustada, onde, desde 2003 com o surgimento dos primeiros clones equídeos, a técnica reprodutiva resultava em taxas de 0,1% a 2,7 (GALLI et al., 2003; WOODS et al., 2003), de 2014 a 2015 entre 5% a 15% (LONG et al., 2014; KEEFER et al., 2015) e, os últimos dados de 2018 demonstram que 35,3% (OLIVERA et al., 2018) do total de animais clonados vivos resultaram em clones saudáveis.

Instituídas pesquisas a respeito das causas das perdas gestacionais nos clones equinos, diversas alterações placentárias foram diagnosticadas tais como vasos umbilicais aumentados, edema placentário, separação do endométrio e placenta, membranas alantoideanas ingurgitadas, placentite, hemorragias e tombos intravasculares nos vasos umbilicais (LAGUTINA et al., 2005; JOHNSON et al., 2010; POZOR, 2016; GAMBINI; MASERATI, 2017).

Determinadas deficiências maternas e fetais na estruturação celular e função placentária podem comprometer o desenvolvimento fetal durante a gestação e causar consequências negativas no crescimento e funções fisiológicas do neonato no período pós-natal (HONG et al., 1993; ROSSDALE et al., 1997).

Atualmente, robustas pesquisas a respeito das anomalias placentária e seus impactos no transcorrer gestacional das espécies estão sendo realizadas, assim como a implicação da condição materna sobre as circunstâncias do desenvolvimento da placenta e repercussão na saúde do feto (POLLACK et al., 1992; MAYHEW et al., 1996, 2007; BARKER, 2006; ABEDZADEH-KALAHROUDI et al., 2021; BRIEN et al., 2021; GUPTA et al., 2021; HUSEN et al., 2021). Da mesma forma, estudos acerca de pontos críticos como as modificações de histonas e metilação do DNA estão sendo realizadas para aumentar a eficiência da clonagem (HILL et al., 2002; BORDINGNON

et al., 2002, 2003; ROBERTS; OLIVA, 2006; MAN et al., 2016; NIEMANN et al., 2016; BUKOWSKI et al., 2017; HAGHIGHI et al., 2020; HAMMA et al., 2020).

Neste sentido, é de suma importância o entendimento da organização e estruturação do trofoblasto em vilosidades coriônicas que ramificam e interdigitam o epitélio endometrial recobrando a superfície alantoideana, assim como a resposta endometrial ao fenômeno gestacional em animais oriundos de SCNT (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1975; SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1977; STEVEN, 1982; POLLACK; DIVON, 1992; INOUE et al., 2020; OLSSON et al., 2022; MALIN et al. 2022).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar o estudo histológico e morfológico a nível ultraestrutural da membrana corioalantóide de éguas gestantes de clones equinos (viáveis e óbitos/ natimortos), fazendo um comparativo com éguas gestantes controle, para diagnosticar parte da ineficiência das trocas materno-fetais e corroborar com o aprimoramento da técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas em equinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA FMVZ-USP) e seu desenvolvimento ocorreu de acordo com as diretrizes da mesma, sob o protocolo 3477230720.

Local e animais

Foram utilizadas no total de 15 membranas corioalantóides de equinos: 5 clonados advindos da SCNT que resultaram em animais viáveis (SCNT viáveis); 5 clonados advindos da SCNT que resultaram em natimortos ou óbitos neonatais até 12 horas após o nascimento (SCNT óbitos/natimortos) e; 5 controles advindos da técnica de Inseminação Artificial e Transferência de Embrião convencional (Controle).

As éguas gestantes de clones equinos ficaram na empresa InVitro Brasil Clonagem Animal, localizada na cidade de Mogi-Mirim, estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 22°25'54" sul; Longitude: 46°57'28" oeste; Altitude: 631 metros). As éguas gestantes controle ficaram instaladas na Fazenda Santa Rita II, localizada em Piracaia, no estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 23°03'14" sul; Longitude: 46°21'29" oeste; Altitude: 792 metros).

As éguas gestantes encontravam-se saudáveis e foram selecionadas de forma randômica em conformidade com a faixa etária (5 a 10 anos), peso (350 a 550kg) e raça (Quarto de milha, Mangalarga, Campolina, Mestiça), onde os partos ocorreram na estação de nascimento 2018/2019.

As éguas foram mantidas em iluminação natural, com fonte de água natural *ad libidum*, à pasto de Tifton em piquetes rotacionados de dimensões médias de 20m X 35m, onde as dietas foram ajustadas de acordo com as necessidades dos animais. Todas as éguas foram rotineiramente vermifugadas e vacinadas em conformidade com protocolo instituído em cada estabelecimento. Nos últimos 40 dias da data prevista do parto, as éguas foram mantidas em piquetes maternidade sob supervisão por período integral.

Coleta e processamento do material biológico

Os partos foram acompanhados por equipe de médica veterinária e, os anexos fetais foram recolhidos imediatamente após o delivramento. A membrana corioalantoide foi disposta sobre uma superfície limpa e plana, formando a letra “F” (ASHBURY; LEBLANC, 1993). Foram realizadas fotografias, com escala graduada em centímetros, para avaliação da área de superfície e mensurada a distância horizontal (cm), da região proximal do corpo uterino até a região distal do corno gravídico e a distância vertical (cm), da região proximal do corno uterino até a estrela cervical (Figura1).

Figura 1 – Acompanhamento do parto de égua participante do experimento (A). Membrana corioalantóide de éguas disposta em “F”, com exposição de lado coriônico (B) e face alantoideana (C)

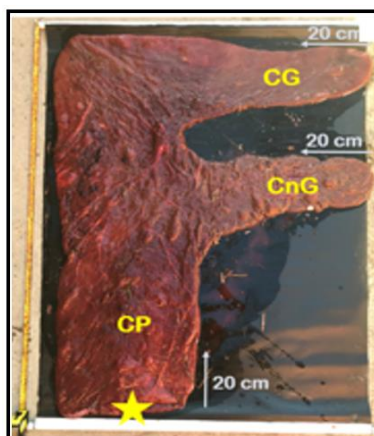


Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Dimensionados os 3 focos amostrais, fragmentos de 2cm² da membrana corioalantoide das regiões de corpo uterino (CP: 20 cm a partir da estrela cervical), corno gestante (CG: 20 cm da região distal do corno gestante) e corno não gestante (CnG: 20 cm da região distal do corno não gestante) foram coletados (Figura 2), identificados, acondicionadas em cassetes histológicos e imersos em paraformaldeído

à 4% tamponado para as análises histológicas. Fragmentos de 1 cm² foram coletados nos mesmo focos amostrais, acondicionadas em criotubos de 5 mL contendo 3 mL de glutaraldeído à 2,5% para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise das ultraestruturas.

Figura 2 – Identificação da padronização da coleta dos focos amostrais na membrana corioalantóide de éguas



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Para a análise histológica as amostras foram emblocadas em parafina e obtidos cortes de 5 µm perpendiculares à superfície coriônica (definida como o plano de referência horizontal) para geração de grupos de cortes verticais (TOLOSA et al., 2003). Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados em microscopia de luz utilizando-se uma objetiva de pequeno aumento (2,5X), médio aumento (10X) e grande aumento (40X).

Para a MEV, os fragmentos de tecido foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes (50 a 100%). Após a desidratação, as amostras foram incluídas em resina Spurr, montadas em suportes metálicos com revestimento de ouro e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM) LEO 435VP na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP.

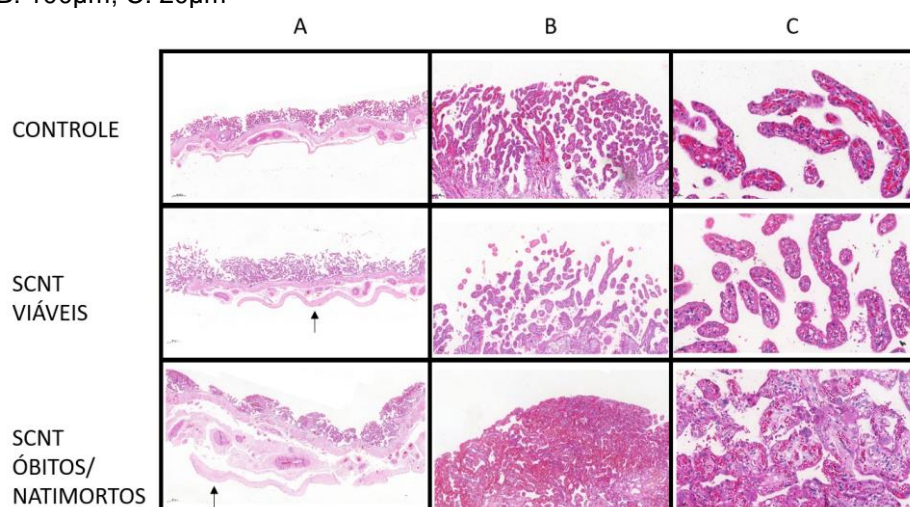
RESULTADOS

Histopatologia das membranas corioalantóides

Na análise histológica mais ampla (Figuras 3A), observa-se em CG que o grupo SCNT viáveis assemelha-se com o grupo Controle quanto a composição tecidual das estruturas da camada do córion com as células colunares altas e mesoderma alantoideano composto por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos. No entanto,

o grupo SCNT óbitos/ natimortos demonstra possuir a camada do córion e mesoderma alantoideano espessos, principalmente em dispor de maior quantidade de células colunares e tecido conjuntivo frouxo em comparação ao grupo Controle. Quando lançado uma acareação entre os grupos SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos, ambos possuem a camada alantoideana (setas pretas) mais hiperplásicas quando comparadas ao grupo Controle. Observamos ainda que o grupo SCNT viáveis possui os vilos microcotiledonários mais alongados e dispersos pelo tecido, já o grupo SCNT óbitos/ natimortos possuem vilos mais curtos porém mais condensados, com maior número de células colunares altas, formando dessa forma uma estrutura de troca vascular mais pontual e densa. Em um estudo isolado da disposição dos vilos (Figuras 3B) e (Figuras 3C), percebemos uma disposição mais compactada dos microcotilédones do grupo SCNT óbitos/ natimortos, onde apresenta maior quantidade de tecido conjuntivo e um aumento da neoangiogênese em comparação aos outros grupos.

Figura 3 – Histologia do CG de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos. Camada alantoideana hiperplásica (setas pretas). Coloração HE. Barra de escala = A: 500 µm; B: 100µm; C: 20µm

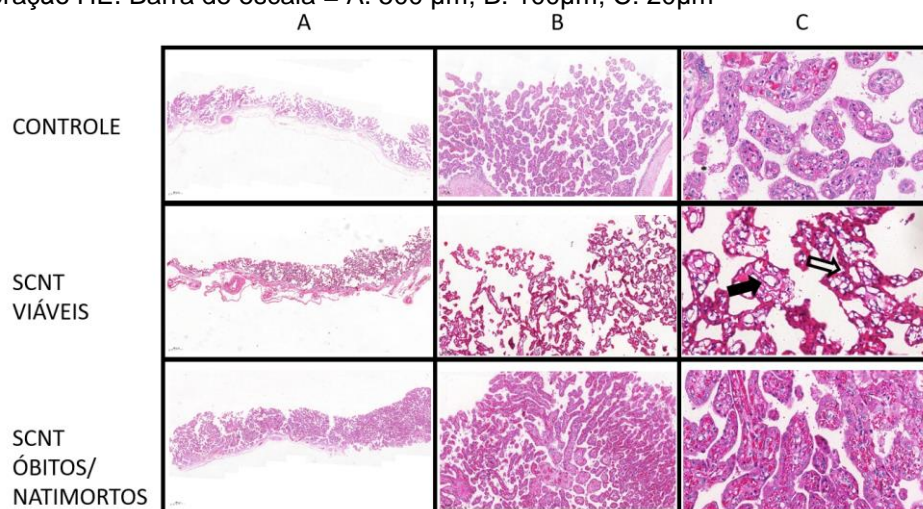


Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

No foco amostral do CNG, em um maior aumento o grupo SCNT viáveis (Figura 4C) demonstra uma desconfiguração estrutural dos vilos microcotiledonários divergente dos demais grupos experimentais, com a presença de vacúolos e células apoptóticas (seta preta vazada) e poucas células trofoblásticas. Ademais, os capilares fetais dispõe de núcleos alongados e menores (seta preta). No grupo SCNT óbitos/ natimortos há maior número de vilos microcotiledonários e capilares fetais, sob a

disposição de maior razão de células colunares altas, quando comparado aos grupo Controle.

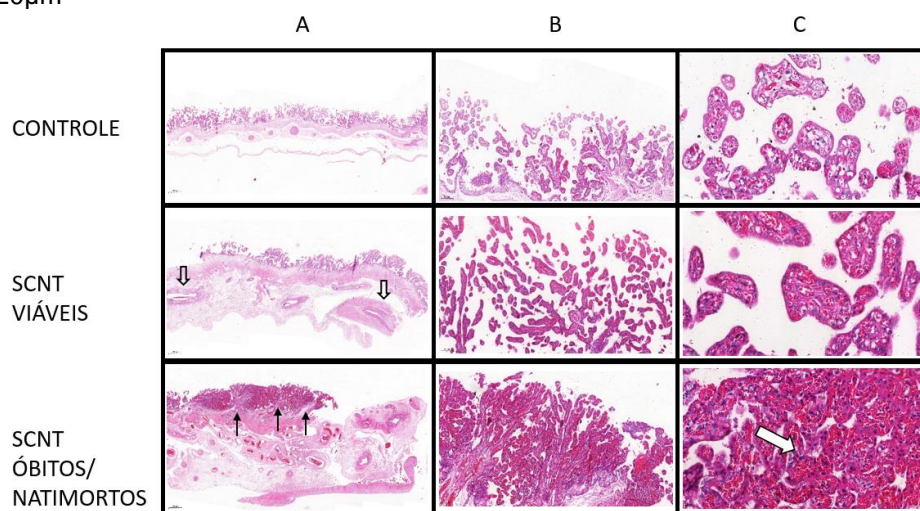
Figura 4 – Histologia do CNG de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos. Presença de vacúolos (seta preta vazada). Núcleos menores e alongados (seta preta). Coloração HE. Barra de escala = A: 500 µm; B: 100µm; C: 20µm



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

A disposição do CP em maior aumento (Figura 5A) nos grupos SCNT óbitos/natimortos e SCNT viáveis, demonstram hiperplasia das camadas do corion com acréscimo da contagem de células colunares altas, mesoderma alantoideano aditado tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos e, ainda este último grupo, possui paredes mais espessas com aumento nas túnica íntima, média e adventícia e com maior raio luminal dos vasos alantoideanos, em comparação ao Controle. No grupo SCNT óbitos/ natimortos, os tufos vilosos (setas pretas) demonstram um maior comprimento de base com o aumento do tecido conjuntivo frouxo e maior contagem de vasos alantoideanos quando comparados aos outros grupos experimentais. Em um maior aumento (Figura 5B) e (Figura 5C), o padrão descrito nos demais focos amostrais se repete com o aumento do número de vilos e células colunares altas pelo grupo SCNT óbitos/ natimortos e com intensa vascularização pelos capilares fetais juntamente com as túnica íntima, média e adventícia. Importante ressaltar que, há um aumento das células binucleadas (seta branca) e os capilares fetais encontram-se mais próximos da membrana basal dos vilos, com a diminuição do tecido conjuntivo no grupo SCNT óbitos/ natimortos.

Figura 5 – Histologia do CP de éguas do grupo Controle, grupo SCNT viáveis e grupo SCNT óbitos/ natimortos. Parede e raio luminal nos vasos alantoideanos (setas pretas vazadas). Tufos vilosos (setas pretas). Células binucleadas (seta branca). Coloração HE. Barra de escala = A: 500 µm; B: 100µm; C: 20µm



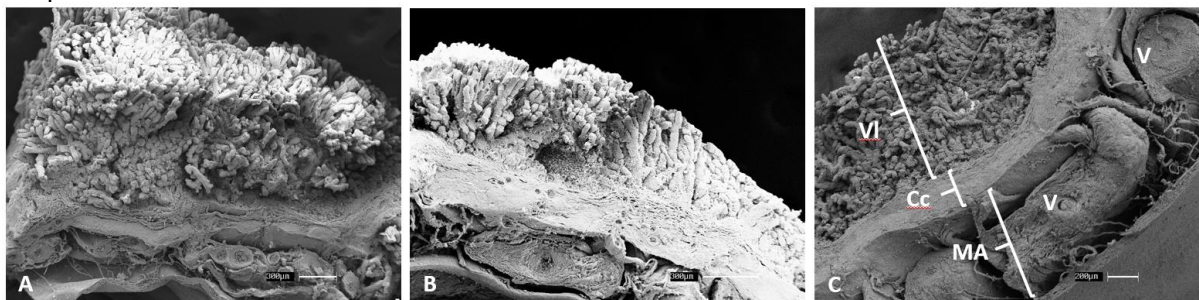
Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Com exceção do CNG do grupo SCNT viáveis, todos os demais focos amostrais dos grupos de SCNTs apresentaram algum grau de infiltrado inflamatório mononuclear, com a presença de macrófagos e linfócitos nas microvilosidades, sobretudo no CP.

Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas corioalantóides

Sob a ótica das ultraestrutura, no CP realizada a análise dos grupos Controle (Figura 6A), grupo SCNT viáveis (Figura 6B) e SCNT óbitos/natimortos (Figura 6C), observamos que há o espessamento da camada do córion (Cc), mesoderma alantoideano (MA) e aumento da vascularização (V) nos grupos SCNTs. Os vilos (VI) no grupo SCNT viáveis apresentam diâmetros maiores e o grupo SCNT óbitos/natimortos demonstram diâmetros menores em maior quantidade (Figura 6).

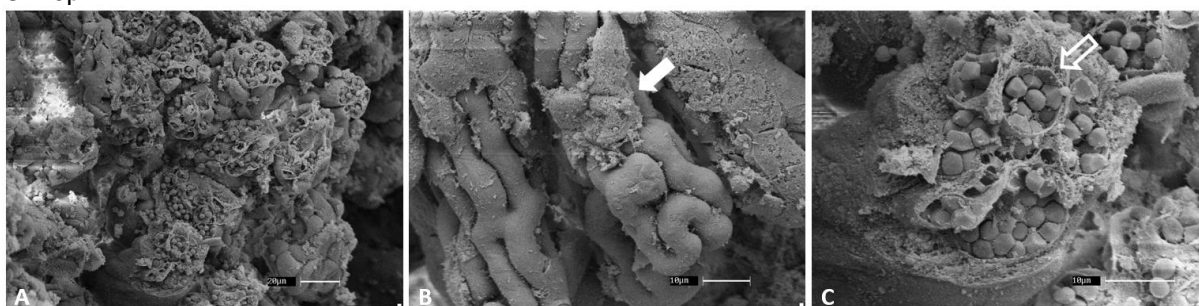
Figura 6 – Microscopia Eletrônica de Varredura do foco amostral do CP de éguas do grupo Controle (A), grupo SCNT viáveis (B) e grupo SCNT óbitos/ natimortos (C), Vilos (VI), camada do córion (Cc), mesoderma alantoideano (MA) e vascularização (V). Barra de escala = A: 300 µm; B: 300µm; C: 200µm



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

À microscopia eletrônica de varredura de maior aumento, verifica-se no foco amostral CP do grupo SCNT óbitos/ natimortos a destruição dos vilos microcotiledonárias (Figura 7A) com a exposição dos capilares fetais - descamação do epitélio trofoblástico (Figura 7B, seta branca), onde há o extravasamento de sangue fetal (Figura 7C, seta vazada).

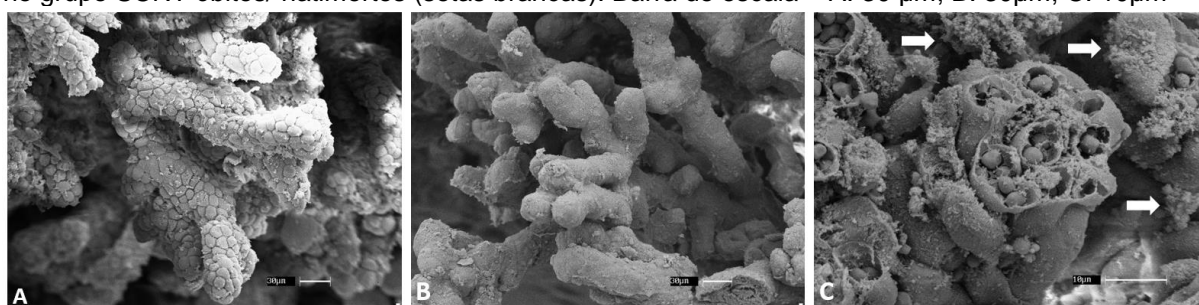
Figura 7 – Microscopia Eletrônica de Varredura do CP de éguas do grupo SCNT óbitos/ natimortos. Destruição dos vilos microcotiledonários (A), descamação do epitélio trofoblástico, seta branca (B) e extravasamento de sangue fetal, seta vazada (C). Barra de escala = A: 20 μ m; B: 10 μ m; C: 10 μ m



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Os grupos SCNTs quando comparados ao grupo Controle (Figura 8A) apresentaram uma fina camada de material ignoto recobrimo de forma integral os vilos no grupo SCNT viáveis (Figura 8B) ou parcialmente os vilos (setas brancas) no grupo SCNT óbitos/ natimortos (Figura 8C) no foco amostral CP.

Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura do CP de éguas do grupo Controle (A), grupo SCNT viáveis (B) e grupo SCNT óbitos/ natimortos (C). Camada ignoto recobrimo parcialmente os vilos no grupo SCNT óbitos/ natimortos (setas brancas). Barra de escala = A: 30 μ m; B: 30 μ m; C: 10 μ m



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

DISCUSSÃO

A placenta é o único canal de trocas materno-fetais, onde os fatores angiogênicos presentes nas vilosidades placentárias facilitam a oxigenação, nutrição e transferências de substâncias em gradientes que se estendem para a circulação materna (KAUFMANN et al., 2003) e promovem o aumento da circulação fetal e

consequentemente o desenvolvimento do conceito (RODESCH *et al.*, 1992). Na busca pela compreensão da funcionalidade placentária, estudos exigem a integração dos dados anatômicos, de desenvolvimento, fisiológicos, genéticos e epigenéticos (RODESCH *et al.*, 1992; REYNOLDS *et al.*, 2001).

Grupo SCNT óbitos/natimortos

Na análise histológica, observamos o espessamento das camadas da membrana corioalantóide - camada do córion, mesoderma alantóideano, camada alantoideana, além da presença de infiltrado inflamatório e aumento da vascularização dos focos amostrais CG e CP no grupo SCNT óbitos/natimortos, que pode estar relacionado a um remodelamento tecidual. A somatória de fatores corrobora com um quadro de placentite, em virtude à insuficiência na funcionalidade desse conjunto de células especializadas (HONG *et al.*, 1993).

A alta quantidade dos vilos por microcotilédone em CG, CNG e CP do grupo SCNT óbito/ natimortos sugere um processo compensatório, onde há uma tentativa de aumentar a área de contato endometrial de forma à intensificar o suprimento de trocas moleculares vital à manutenção da gestação, em razão de deficiente trocas materno-fetais. A densidade vascular placentária é regulada de acordo com a necessidade de aporte sanguíneo para o feto e mesmo para a própria placenta. Bianco e colaboradores (2014), por meio de análises morfométricas de placentas equinas, demonstraram que as vilosidades coriônicas tendem a ter maior complexidade e ramificação em direção ao endométrio em potros doentes do que em potros saudáveis.

O grupo SCNT óbitos/natimortos ainda expressaram uma maior contagem de células binucleadas. De acordo com Heyman *et al.* (2002), as células binucleadas identificadas em fetos bovinos provenientes de SCNT, estão altamente relacionados com síndrome do bezerro grande “large offspring syndrome” (LOS), hidroalantóide e abortamentos, onde secretam uma proteína conhecida como PSP60. A alta concentração dessa proteína é disponível na circulação materna e está relacionada ao aumento da atividade placentária. Uma comparação realizada com animais oriundos de SCNT e convencionais demonstraram que há o aumento das concentração da PSP60 no grupo clones como um indicativo do desenvolvimento anormal placentário com o intuito de efeito compensatório.

No foco amostral CNG, o grupo óbitos/natimortos manifestou uma maior disposição de vilos tanto em quantidade e avanço no sentido endometrial. Esse mecanismo pode ser uma maneira de corrigir falhas de trocas materno-fetais nas demais regiões placentárias.

O grupo SCNT óbitos/natimortos exibe uma neoangiogênese em CP superior aos demais grupos experimentais, onde os capilares fetais se deslocam para a região do epitélio trofoblástico e os trofoblastos são encontradas de forma esporádicas pela lâmina histológica. Essa circunstância é ilustrada pela imagem da MEV no foco amostral em questão (Figura 7), onde a camada de revestimento dos vilos coriônicos estão com aspecto danificado e os capilares fetais rompidos, expondo o conteúdo vascular placentário. Em bovinos, disfunção na frequência de apoptose nas células da placenta podem refletir em enfermidades fetais. Em humanos, mulheres com pré-eclâmpsia expressaram menores ou ausentes níveis da proteína BCL-2, sugerindo maior chance de ocorrer apoptose e desconfiguração das estruturas celulares nessas gestações (BOOS et al., 2003).

De acordo com Shawn et al. (2005), o aumento da frequência de apoptose pelas células placentárias são indicativos de pré-eclâmpsia, que podem ter origem de acordo com o estresse oxidativo no qual é causado por um quadro de hipóxia. A apoptose também foi evidenciada em cultura de células de citotrofoblasto humano no primeiro trimestre de gestação que foram submetidas a um estresse oxidativo em cultura (*in vitro*).

Semelhante ao encontrado por esta pesquisa no grupo SCNT óbitos/ natimortos, em um estudo realizado em placenta de bovinos clonados, Verechia et al., (2003), demonstraram que esses animais apresentavam poucas árvores vilosas, onde os vilos apresentavam um arranjo desorganizado, com algumas células trofoblásticas exibindo núcleos alterados.

Em clones suínos, a morfologia e função prejudicadas de placentas derivadas de SCNT, podem ser devido à desregulação maciça de genes impressos, que podem ser resultado de reprogramação epigenética aberrante durante o desenvolvimento do embrião clonado (AO; LIU; ZHAO et al., 2017).

Grupo SCNT viáveis

Semelhante ao ocorrido no grupo SCNT óbitos/natimortos, a camada alantoideana em CG demonstra um espessamento, da mesma forma que verificado na camada do córion e mesoderma alantoideano em CP. Os vasos alantoideanos em CP possuem paredes espessas e raio luminal maior quando comparados ao grupo controle.

A somatória dos achados acima, aliado à disposição dos vilos em CG, onde há uma maior distribuição das vilosidade e avanço em direção ao endométrio materno, e em sua totalidade a disposição dos capilares fetais, epitélio trofoblástico e tecido conjuntivo mais equivalente com a organização histológica e citológica do grupo controle, pode justificar em parte a efetividade do desenvolvimento do feto, mesmo que com as adaptabilidades realizadas pelo organismo para a manutenção da gestação e viabilidade fetal. Em estudos realizado em humanos, uma das funções comprovada do trofoblasto é invasão em direção ao miométrio materno durante o primeiro trimestre de gestação, aumentando a capacidade angiogênica por meio de fatores de crescimento, promovendo a vascularização durante o desenvolvimento fetal (LI *et al.*, 2004). O trofoblasto também é capaz de direcionar e auxiliar o remodelamento dos vasos para um desenvolvimento e diferenciação dos vilos na placenta (KAUFMANN *et al.*, 2003).

Surpreendentemente, no foco amostral do CNG, identificamos uma desarranjo na morfologia dos vilos, onde há a presença de vacúolos e escassas células trofoblásticas. Essa desorganização do epitélio trofoblastico, tecido conjuntivo e capilares fetais, pode não estar relacionada à dependência direta desse foco amostral com a viabilidade fetal.

Foco amostral Corpo do Útero

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, observamos em CP uma camada de material desconhecido recobrimdo a superfície do vilo de forma parcial no grupo SCNT óbitos/natimortos e praticamente total no grupo SCNT viáveis. Talvez a disposição parcial da deposição do material no grupo SCNT óbitos/natimortos seja em relação a desestruturação e fragilidade do epitélio trofoblastico, característica do grupo experimental. Essa camada de substância desconhecida está sobreposta às

células trofoblásticas, alterando a morfologia das projeções coriônicas do clássico formato de “amora” para células sem delineamento definido, além de aumentar a barreira placentária, podendo dificultar as trocas materno-fetais.

Uma hipótese acerca dessa substância é de que, diante dos espaços adjacentes dos microcotilédones, as áreas de aréolas continuem presentes e funcionais a fim de continuar a oferta de histotrofo para o feto (ALLEN; WILSHER, 2003). Nesse caso estaríamos diante da nutrição fetal recobrando as vilosidades microcotiledonárias.

Entretanto, um recente estudo realizado em amostras uterinas de gestações bovinas concebidas a partir de SCNT elucidaram que, comparado ao grupo controle, o trofoblasto de gestações incompatíveis heterozigóticas MHC-I expressaram níveis de citocinas pró-inflamatórias aumentados na interface materno-fetal. As observações dos autores fornece informações a respeito da regulação positiva de genes do sistema imunológico nas células trofoblásticas de conceptos SCNT bovinos e a desregulação da expressão de miRNA de células trofoblásticas, sugerindo fortemente que as células trofoblásticas têm importante função imunorreguladora e provavelmente amplificadora das respostas imunes uterinas pró-inflamatórias (RUTIGLIANO et al., 2022). Já nessa situação, teríamos alguns fatores imunológicos mediando e modulando de forma química e mecânica as trocas materno fetais nos vilos dos microcotilédones.

Dessa forma, não podemos afirmar com as ferramentas disponíveis desse estudo a origem da substância, necessitando de mais pesquisas a respeito desse fenômeno identificados nos SCNTs.

CONCLUSÃO

No grupo SCNT óbitos/ natimortos observamos em CG maior quantidade células colunares altas, superior quantidade de tecido conjuntivo frouxo e sugestivo processo neoangiogênico. Na região de CNG, a maior quantidade de vilos foi acompanhada pelo aumento do número de células colunares altas e capilares fetais. Já na região de CP, o grupo SCNT óbitos/ natimortos foi observado menor quantidade de tecido conjuntivo frouxo (quando contraposto com a quantidade de vilos), intensa vascularização, aumento de células binucleadas, maior contagem de células colunares altas e capilares fetais, onde a configuração destes últimos acompanha a membrana basal do trofoblasto. A região de CP ainda, dispõe de destruição do epitélio

trofoblasto, com exposição dos capilares fetais nas vilosidades microcotiledonárias e extravazamento sanguíneo. Há sobreposto sobre essa região placentária, de forma parcial – talvez devido ao disforme vilar, uma fina camada de material cuja composição é incerta.

No grupo SCNT viáveis foi percebido em CG, maior quantidade de células colunares altas com vilos mais alongados. Em CNG o grupo experimental já mencionado, apresentou desconfiguração das estruturas histológicas, onde houve pouca contagem de células trofolásticas, presença de vacúolos e células apoptóticas e, nos capilares feitas contatamos núcleos menores e mais alongados. Neste mesmo grupo, na região de CP pudemos observar maior número de células colunares altas e espessamento das túnicas íntima, média a adventícia além de maior raio do lúmen dos vasos sanguíneos quando comparadas estruturas com o grupo controle. Uma fina camada de material desconhecido foi identificado recobrimdo de forma total as vilosidades coriônicas.

Todos os focos amostrais nos grupos de SCNTs, com exceção do CNG do grupo SCNT viáveis, apresentaram algum grau de infiltrado inflamatório mononuclear, com a presença de macrófagos e linfócitos nas microvilosidades, majoritariamente na região placentária de corpo do útero.

Salientamos que, mais estudos são necessários para a compreensão das anormalidade placentárias em equinos provenientes de Transferência Nuclear de Células Somáticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES (Processo 88887.503458/2020-00) pela concessão de bolsa, à FAPESP (nº 2020/10260-3) pelo financiamento deste projeto de pesquisa. Obrigada à Dra. Mariana Abreu Redoan, Dra. Juliana Izzo Octaviano e Dra. Thaís Naomi Gonçalves Nesiya por toda a ajuda na coleta do material biológico.

REFERÊNCIAS

ABEDZADEH-KALAHROUDI, M. et al. Maternal and neonatal outcomes of pregnant patients with COVID-19: A prospective cohort study. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 153, n. 3, p. 449-456, jun. 2021.

ALLEN, W.R.; CARTER, A.M.; CHAVATTE-PALMER, P.; DANTZER, V.; EENDERS, A.C.; FREYER, C.; LEISER, R.; MIGLINO, M.A. "Comparative placentation - a workshop report". *Placenta*. Apr; 24 Suppl A:S100-3, 2003.

AO Z, LIU D, ZHAO C, YUE Z, SHI J, ZHOU R, CAI G, ZHENG E, LI Z, WU Z. Birth weight, umbilical and placental traits in relation to neonatal loss in cloned pigs. *Placenta*, Sep;57:94-101, 2017.

ASBURY, A.C.; LeBLANC, M.M. The placenta. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Pennsylvania: Lea & Febiger, p.509-516. 1993.

BARKER, D. J. P. Chronic disease in humans originates in the intra-uterine environment. *Anim Reprod Sci.*, 94(1–4):343–54, 2006.

BRIEN, M. E. et al. Pandemic stress and SARS-CoV-2 infection are associated with pathological changes at the maternal-fetal interface. *Placenta*, v. 115, p. 37-44, nov. 2021.

BIANCO, C. et al. Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from healthy and sick foals. *Theriogenology*, v. 82, n. 8, p. 1106- 1112.e1, 2014.

BORDINGNON, V.; SMITH, L. "Clonagem animal por transferência nuclear" In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, P. 281-303, 2002.

BORDINGNON, V. "Clonagem de animais por transferência nuclear: Avanços e desafios". *Acta Scientiae Veterinarie*. Supl. 31, P. 64-73, 2003.

BOOS, A., JANSSEN, J., MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomas during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v.126, p.469-480, 2003.

BUKOWSKI, R; HANSEN, NI; PINAR, H; WILLINGER, M; REDDY, UM; PARKER, CB, et al. Altered fetal growth, placental abnormalities, and stillbirth. *PLoS ONE*, 12(8):e0182874, 2017.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, Mar 7;380(6569):64-6, 1996.

GALLI, C. et al. A cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v. 424, p. 635, 2003.

GAMBINI, A.; MASERATI, M. A journey through horse cloning. *Reprod Fertil*, Jan;30(1):8-17, 2017.

GUPTA, P.; KUMAR, S.; SHARMAR, S. S. SARS-CoV-2 prevalence and maternal-perinatal outcomes among pregnant women admitted for delivery: Experience from COVID-19-dedicated maternity hospital in Jammu, Jammu and Kashmir (India). *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 9, p. 5505-5514, set. 2021.

HAGHIGHI, L; JAHANSHAHI, F. Two knots is an umbilical cord seventy centimeter length: a case report. *Clinical Case Report.*, 8: 1579- 1581, 2020.

HAMMA, IA; BLUE, NR; ALLSHOUSE, AA et all. Umbilical cord abnormalities and stillbirth. *Obstetrics & Gynecology*, 135: 644 – 652, 2020.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURTHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 6-13, 2002.

HILL, J.R.; SCHLAFER; D.H.; FISHER; P.J.; DAVIES, C.J. "Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class i antigens in cloned bovine

pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response¹". *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 55–63, 2002.

HONG, C.B.; DONAHUE, J.M.; GILES, R.C. et al. Etiology and pathology of equine placentitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 5 (1): 56-63, 1993.

HUSEN, M. F. et al. Unique severe COVID-19 placental signature independent of severity of clinical maternal symptoms. *Viruses*, v. 13, n. 8, p. 1670, ago. 2021.

INOUE, K. et al. Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfbmt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas. *Nat Commun.*, 11, p. 2150, 2020.

JOHNSON, A. K. et al. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 236, n. 9, p. 983–990, 2010.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, v.69, n.1, p.1-7, 2003.

KEEFER, C. L. Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 29, p. 8874–8878, 2015.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; PONDERATO, N.; TURINI, P.; CROTTI, G.; GALLI, C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction.*, Oct;130(4):559-67, 2005.

LI, W.; ALFAIDY, N.; CHALLIS, J.R. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v.89, p.2897-2904, 2004.

LONG, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; GOLDING, M. C. Reshaping the transcriptional

frontier: Epigenetics and somatic cell nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, v. 81, n. 2, p. 183–193, 2014.

MALIN, K.; WITKOWSKA-PITASZEWICZ, O.; PAPIS, K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. *Theriogenology*, p.246-254, Vol. 189, Sept., 2022.

MAN, J; HUTCHINSON, JC; HEAZELL, AE; ASHWORTH, M; JEFFREY, I; SEBIRE, NJ. Stillbirth and intrauterine fetal death: role of routine histopathological placental findings to determine cause of death. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 48(5): 579-584, 2016.

MAYHEW TM. Patterns of villous and intervillous space growth in human placentas from normal and abnormal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 68(1-2):75-82, 1996.

MAYHEW TM, MANWANI R, OHADIKE C, WIJESEKARA J, BAKER PN. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: studies on exchange surface areas, diffusion distances and villous membrane diffusive conductances. *Placenta*. Feb-Mar;28(2-3):233-8, 2007.

MIGLINO, M. A. Clonagem Animal e Pacentação. *Ciência e Cultura*, v. 56, p. 31–33, 2004.

OLIVERA, R. Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. *Stem Cells Cloning Adv Appl.*, 11:13–22, 2018.

OLSSON, P.O.; JEONG, Y.W.; JEONG, Y. et al. Insights from one thousand cloned dogs. *Sci Rep*. Jul 1;12(1):11209, 2022.

NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology*, 86, p. 80-90, 2016.

POLLACK, R. N.; DIVON, M. Y. Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology. *Clinical obstetrics and gynecology*, v. 35, n. 1, p. 99-107, 1992.

POZOR, M. A. et al. Placental abnormalities in equine pregnancies generated by SCNT from one donor horse. *Theriogenology*, v. 86, n. 6, p. 1573–1582, 2016.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the placenta. *Biol. Reprod.*, v.64, n.4, p.1033-1040, 2001.

RODESCH, F.; SIMON, P.; DONNER, C; JAUNIAUX, E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, v,80, n.2, p.283-285, 1992.

ROBERTS, DJ; OLIVA, E. Clinical significance of placental examination in perinatal medicine. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.*, 5: 255 – 264, 2006.

ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C.; CHAVATTE-PALMER, P. Readiness for birth: an endocrinological duet between fetal foal and mare. *Equine Vet J Suppl.*, 24(24):96–9, 1997.

RUTIGLIANO HM, THOMAS AJ, UMBAUGH JJ, WILHELM A, SESSIONS BR, KAUNDAL R, DUHAN N, HICKS BA, SCHLAFER DH, WHITE KL, DAVIES CJ. Increased expression of pro-inflammatory cytokines at the fetal-maternal interface in bovine pregnancies produced by cloning. *Am J Reprod Immunol.*, Mar;87(3):e13520, 2022.

SAMUEL, C.A.; ALLEN W.R.; STEVEN D. H. Ultrastructural development of the equine placenta. *J Reprod Fertil*, (Suppl 23):575–8, 1975.

SAMUEL, C.A.; ALLEN W.R.; STEVEN D. H. Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. *J Reprod Fertil*, 51:433–7, 1977.

SHAWN L.S.; VIKKI M. A.; GIL, M. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation during Pregnancy. *Endocrine Reviews* 26(7):877–897, 2005.

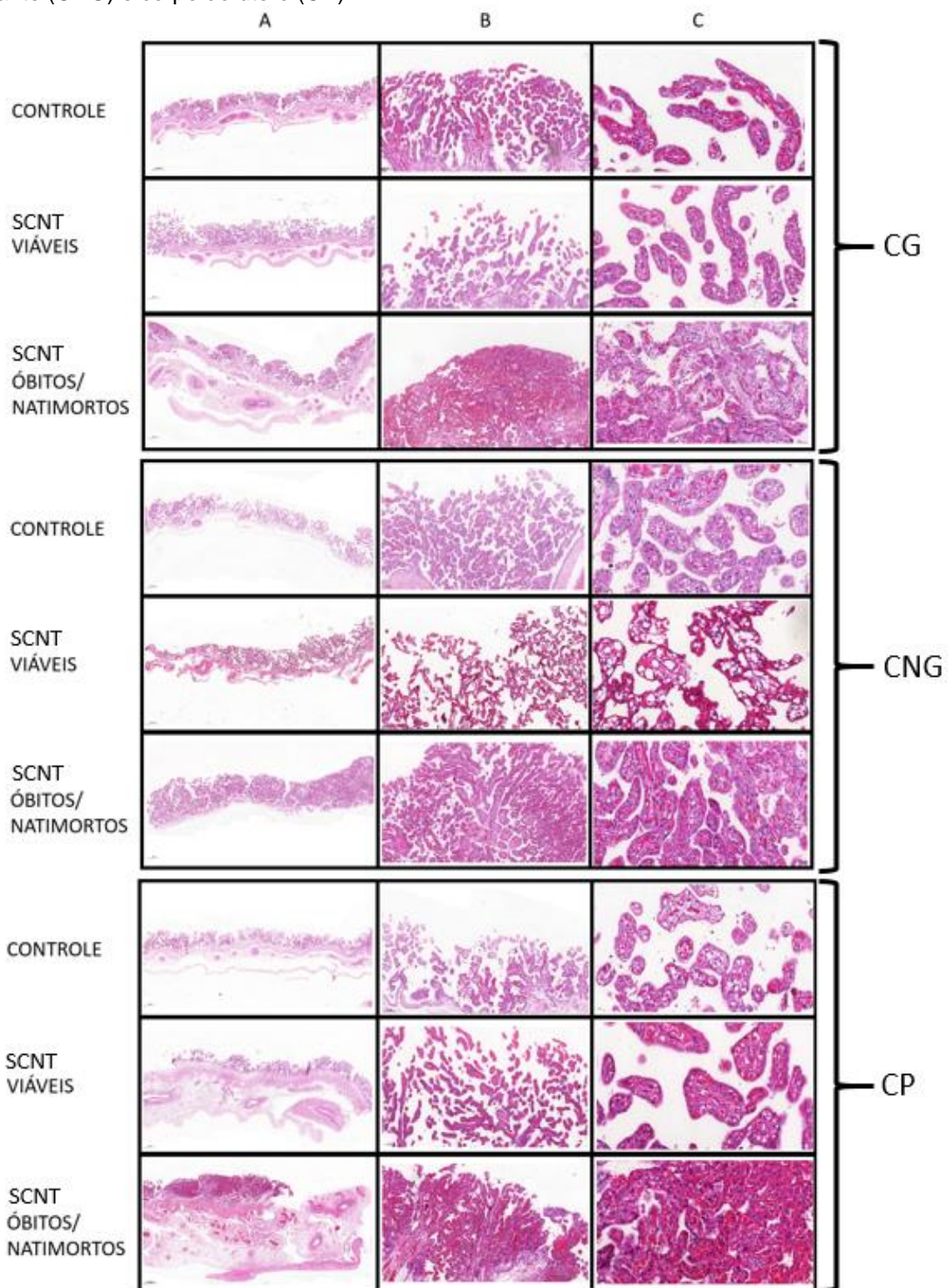
TOLOSA, E.M.C. et al. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2.ed. São Paulo: Manole, 2003.

STEVEN D. H. Placentation in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 31: 41–55, 1982.

VERECHIA, F. T.; MIGLINO, M. A.; VISITIN, M. B.; MANSANO, J.; YAMASAKI, W.; AMBRÓSIO, C. E.; CARVALHO, A. F.; BRAGA, F. C.; SANTOS, T. C.; LEISER, R. Placentação em bovinos clonados: arquitetura microvascularização e estrutura. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003. Ribeirão Preto. Anais... [Ribeirão Preto]: [s. n.], 2003.

WOODS, G. L. et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v. 301, n. 5636, p. 1063, 2003.

Anexo 1 - Painel histológico comparativo da membrana corioalantoideana de éguas gestante de Controle, SCNT viáveis, SCNT óbitos/ natimortos das regiões de corno gestante (CG), corno não gestante (CNG) e corpo do útero (CP)



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

4 ARTIGO 2

COMPARAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDEANA DE ÉGUAS GESTANTES DE CLONES EQUINOS VIÁVEIS, ÓBITOS/ NATIMORTOS E CONTROLE

Francieli Pereira Carneiro¹, Marcilio Nichi¹, Bárbara Kolecha Costa¹, Maria Augusta Alonso², Perla Dagher Cassoli Fleury³, Claudia Barbosa Fernandes¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP

² Fazenda Santa Rita II – Piracaia/SP

³ InVitro Equinos – Mogi Mirim/SP

RESUMO

A placenta é o único meio de trocas materno-fetais que possibilita o desenvolvimento da gestação. Investigações morfológicas e estereológicas placentárias demonstram a plasticidade desse órgão transitório. Por meio de co-relações é possível apurar patologias de origem materna ou origem embrionária. As repercussões da anomalia placentária podem ser manifestadas em vários estágios de vida do indivíduo. Estudos na clonagem equina por Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT) demonstram uma série de anormalidades placentárias como membrana alantoideana espessa, vasos alantoideanos congestionados, placentite, além de uma somatória de achados umbilicais anormais, torna-se impreterível o estudo das membranas corioalantoideana de clones equinos. Neste sentido, o presente estudo buscou compreender por meio da estereologia, o volume total da membrana corioalantoideana, volume total das regiões placentárias, densidade, altura e largura dos microcotilédones e a altura da camada do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana mediante sua totalidade, em cada região placentária de corno gravídico (CG), corno não gravídico (CNG) e corpo do útero (CP) de gestações provenientes de SCNT viáveis (n=5), SCNT óbitos/ natimortos até 12 horas de nascimento (n=5) e Controle oriundas de inseminação artificial e transferência embrionária convencional (n=5). Os resultados demonstraram que, o grupo SCNT viáveis apresentou menores valores da Largura dos microcotilédones. O grupo SCNT óbitos/ natimortos obteve maior volume total da membrana corioalantoideana; maior

volume na região de corpo do útero e menor na região de corno não gravídico; maior altura na totalidade das camadas do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana; uma tendência de alta na Altura dos vilos. Os grupos SCNTs, demonstraram menor Densidade microcotiledonária em relação ao grupo Controle. Enfatizamos que mais estudos são necessários para a compreensão do remodelamento placentário na espécie equina.

Palavras-chave: Clones equinos. Membrana corioalantoideana. Estereologia.

ABSTRACT

The placenta is the only means of maternal-fetal exchange that enables the development of gestation. Placental morphological and stereological investigations demonstrate the plasticity of this transitional organ. By means of co-relations it is possible to ascertain pathologies of maternal origin or embryonic origin. The repercussions of placental abnormality can be manifested at various stages of the individual's life. Studies in equine cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) demonstrate a series of placental abnormalities such as thickened allantoidean membrane, congested allantoidean vessels, placentitis, besides a sum of abnormal umbilical findings, making it imperative to study the chorioallantoidean membranes of equine clones. In this sense, the present study sought to understand by means of stereology, the total volume of the chorioallantoidean membrane, total volume of the placental regions, density, height and width of the microcotyledons and the height of the chorion layer, allantoidean mesoderm and allantoidean layer through its entirety, in each placental region of gravid horn (CG), non gravid horn (NGC) and body of uterus (BW) of pregnancies from viable SCNT (n=5), deceased/dead SCNT within 12 hours of birth (n=5) and Control from artificial insemination and conventional embryo transfer (n=5). The results showed that, the viable SCNT group presented lower values of microcotyledon width. The SCNT death/death group obtained higher total volume of the chorioallantoid membrane; higher volume in the uterine body region and lower in the non gravid horn region; higher height in the totality of the chorion layers, allantoid mesoderm and allantoid layer; an upward trend in Villus Height. The SCNTs groups, demonstrated lower Microcotyledon Density compared to the Control group. We emphasize that further studies are needed for the understanding of placental remodeling in the equine species.

Keywords: Equine clones. Chorioallantoide membrane. Stereology.

INTRODUÇÃO

A placenta é o único órgão transitório de transferência materno-fetal que possibilita todas as trocas moleculares indispensável para a manutenção da gestação (ALLEN et al., 2002). Diversos estudos estereológicos das gestações demonstram que, o desenvolvimento do conceito está relacionado com modificações durante o período gestacional que impactam a morfologia e funcionalidade da placenta (MAYHEW et al., 2003, 2007, 2008; VERAS et al., 2008; SALAZAR-PETRES et al., 2022).

Em humanos, a morfologia disfuncional placentária foi relacionado à gestações complicadas ou comprometidas por enfermidades de origem materna como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, diabetes mellitus e doenças virais como a COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2 que compromete o sistema imunológico, causando sofrimento fetal (POLLACK et al., 1992; MAYHEW et al., 1996, 2003; BARKER, 2006; ABEDZADEH-KALAHROUDI et al., 2021; BRIEN et al., 2021; GUPTA et al., 2021; HUSEN et al., 2021). Há também as disfuncionalidades de origem fetal como a falha na programação celular, sinalização endocrinológica e atipicidade do cordão umbilical resultando em deficiente aporte sanguíneo fetal (ROBERTS; OLIVA, 2006; MAN et al., 2016; BUKOWSKI et al., 2017; HAGHIGHI et al., 2020; HAMMA et al., 2020).

Uma placenta insuficiente onde não supre o aporte vascular adequado para o desenvolvimento do feto, mesmo que o mesmo venha a termo, pode causar baixo peso ao nascimento, deficiências de conexão neural, prejudicar as células do córtex cerebral, podendo impactar de forma permanente em todos os anos de vida do indivíduo (BARKER et al., 1989; BARKER, 1995; SAMUELSEN et al., 2007; VAKIL et al., 2022).

Em um estudo morfométrico realizado em placenta equina, constatou que, uma placenta com menor composição estrutural, menor vascularização refletirá na diminuição da passagem de nutrientes e oxigênio para o feto, conseqüentemente afetando negativamente quanto ao vigor do potro pós nascimento (MEIRELLES et al., 2017).

Ponderando sobre a oportunidade da quantidade e qualidade de produção de animais, com o avanço das biotecnologias reprodutivas, a clonagem equina tem ganhado cada vez mais destaque, na possibilidade de recriação de animais com

genética comercialmente/esportivamente relevantes. Todavia, a técnica possui baixa eficiência, sendo relatado várias anormalidades placentárias como placentites, membrana alantoideana espessa, vasos umbilicais dilatados, vasos alantoideanos congestos e com maiores calibres (LAGUTINA et al., 2005; JOHNSON et al., 2010; POZOR, 2016; GAMBINI; MASERATI, 2017;).

Dado a relevância da clonagem e seus impactos no bem-estar animal, objetivamos nesse estudo o detalhamento estereológico da membrana corioalantóide de éguas gestantes de clones equinos (viáveis e óbitos/ natimortos), fazendo um comparativo com éguas gestantes controle, para diagnosticar parte da ineficiência das trocas materno-fetais e corroborar com o aprimoramento da técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas em equinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA FMVZ-USP) e seu desenvolvimento ocorreu de acordo com as diretrizes da mesma, sob o protocolo 3477230720.

Local e animais

No presente projeto de pesquisa foram utilizadas 15 membranas corioalantoideanas de equinos: 5 clonados provenientes da SCNT que resultaram em animais viáveis (SCNT viáveis); 5 clonados provenientes da SCNT que resultaram em natimortos ou óbitos neonatais até 12 horas após o nascimento (SCNT óbitos/ natimortos) e; 5 controles provenientes da técnica de Inseminação Artificial e Transferência de Embrião convencional (Controle).

As éguas gestantes de clones equinos ficaram alojadas na empresa InVitro Brasil Clonagem Animal, localizada na cidade de Mogi-Mirim, estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 22°25'54" sul; Longitude: 46°57'28" oeste; Altitude: 631 metros). As éguas gestantes controle ficaram instaladas na Fazenda Santa Rita II, localizada em Piracaia, no estado de São Paulo, Brasil (Latitude: 23°03'14" sul; Longitude: 46°21'29" oeste; Altitude: 792 metros).

Todas as éguas encontravam-se híginas nas quais foram selecionadas de forma randômica de acordo com a faixa etária (5 a 10 anos), peso (350 a 550kg) e raça

(Quarto de milha, Mangalarga, Campolina, Mestiça), em que os partos ocorreram na estação de nascimento 2018/2019.

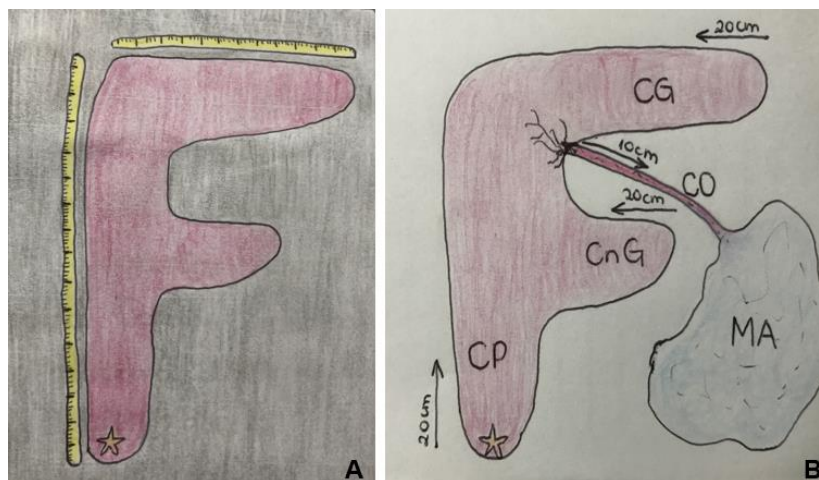
As éguas foram mantidas à pasto de Tifton em piquetes rotacionados de dimensões médias de 20m X 35m, onde as dietas foram ajustadas de acordo com as necessidades dos animais, dispunha de iluminação natural, com fonte de água natural *ad libidum*. Todas as éguas foram rotineiramente vacinadas e vermifugadas em conformidade com protocolo instituído em cada propriedade. Nos últimos 40 dias da data prevista do parto, as éguas foram mantidas em piquetes maternidade sob supervisão veterinária por período integral.

Coleta e processamento do material biológico

Os partos foram acompanhados por equipe médica veterinária e, os anexos fetais foram recolhidos imediatamente após o delivramento. A membrana corioalantoideana foi disposta sobre uma superfície limpa e plana, formando a letra “F” (ASHBURY; LEBLANC, 1993). Foram realizadas fotografias, com escala graduada em centímetros, para avaliação da área de superfície e mensurada a distância horizontal (cm), da região proximal do corpo uterino até a região distal do corno gravídico e a distância vertical (cm), da região proximal do corno uterino até a estrela cervical. O peso total dos anexos fetais (kg) e o peso da membrana corioalantoideana (kg) foram obtidos por meio de balança convencional, além de observados aspecto, integridade e coloração tecidual.

Dimensionados os 3 focos amostrais, fragmentos de 2cm² da membrana corioalantoideana das regiões de corpo uterino (CP: 20 cm a partir da estrela cervical), corno gestante (CG: 20 cm da região distal do corno gestante) e corno não gestante (CNG: 20 cm da região distal do corno não gestante) foram coletados (Figura 1), identificados, acondicionadas em cassetes histológicos e imersos em paraformaldeído à 4% tamponado para as análises estereológicas.

Figura 1 – Esquema de mensuração em centímetro da membrana corioalantóideana (A). Identificação da padronização da coleta dos focos amostrais na membrana corioalantóide (B)



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

As amostras foram emblocadas em parafina e obtidos cortes de 5 μm perpendiculares à superfície coriônica (definida como o plano de referência horizontal) para geração de grupos de cortes verticais (TOLEDO et al., 2015). Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados em microscopia de luz utilizando-se uma objetiva de pequeno aumento (2X).

Para a estereologia e morfometria placentária foram realizadas imagens digitalizadas das lâminas das regiões da placenta (CG, CnG e CP), utilizando o software CaseViewer® (<https://www.3dhistech.com/>). O sistema teste utilizado para estimar os compartimentos placentários foram sobrepostos nos campos de visão usando o software de domínio público NIH *Image J*® (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Análise estereológica

VOLUME TOTAL DA MEMBRANA CORIOALANTOIDEANA

O volume total da membrana corioalantoideana (cm^3) foi calculado a partir da razão peso da membrana corioalantoideana (g) pela densidade específica do tecido (g/cm^3). Em concordância ao padronizado por Mayhew (2003), o valor de densidade específica do tecido utilizado foi de $1,05 \text{ g}/\text{cm}^3$.

VOLUME TOTAL DAS REGIÕES PLACENTÁRIAS

O volume total de cada macrocompartimento placentário: corno gestante (CG), corno não gestante (CnG) e corpo do útero (CP), foi obtido pela contagem de pontos

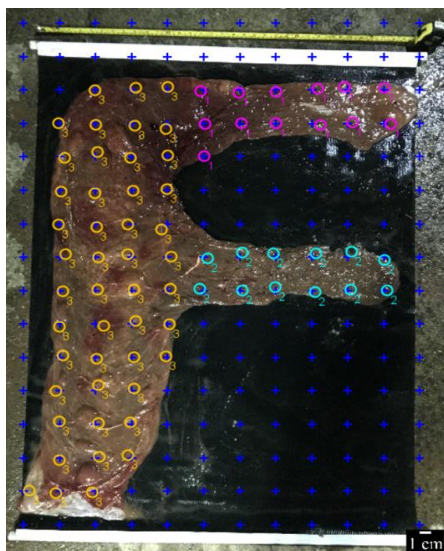
descrita por Howard e Reed (2005) utilizando o software *Image J*®. A metodologia consistiu na aplicação de um teste de pontos sobre a membrana corioalantoide, contagem dos pontos incidentes sobre a mesma e sobre cada macrocompartimento de interesse (Figura 2).

A fração de volume de cada região placentária (V_{varea}) foi calculada dividindo-se a somatória dos pontos incidentes sobre o macrocompartimento de interesse (Σpt_{area}) pela somatória dos pontos incidentes sobre membrana corioalantoideana como um todo (Σpt_{plac}).

$$V_{varea} = \Sigma pt_{area} \div \Sigma pt_{plac}$$

Por sua vez, o volume total de cada macrocompartimento placentário (V_{area}) foi obtido pela multiplicação da fração de volume de cada região (V_{varea}) pelo volume total da membrana corioalantoideana (V_{plac}).

Figura 2 – Aplicação do sistema teste sobre fotografia da membrana corioalantóideana equina, utilizando o programa *Image J*®



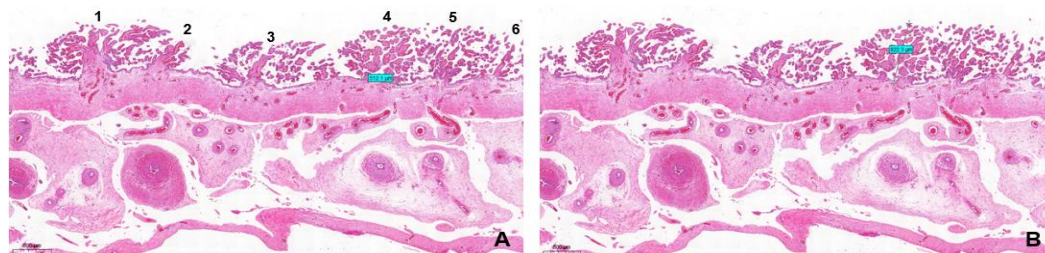
Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

DENSIDADE, ALTURA E LARGURA DOS MICROCOTILÉDONES

A densidade, largura da base e altura dos microcotilédones foram estimadas por meio de micrografia de objetiva de menor aumento (2X) obtida pelo Software *Image J*®. No cálculo da densidade microcotiledonária foram considerados o número

de microcotilédones por comprimento na região de interesse da membrana corioalantoideana. Para a largura da base e a altura dos microcotilédones foi realizada mensuração direta da micrografia (Figura 3).

Figura 3 – Determinação da Densidade, Largura (A) e Altura (B) da região placentária equina, utilizando o programa Image J®. Coloração HE. Barra de escala = 500 µm

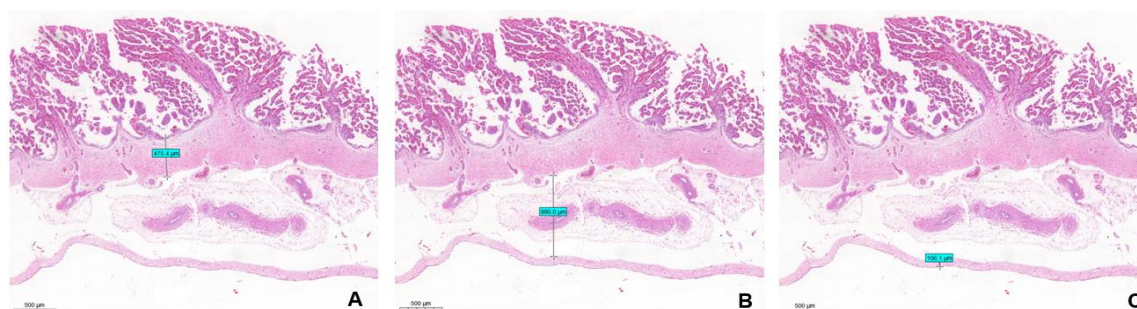


Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

ALTURA DA CAMADA DO CÓRION, MESODERMA ALANTOIDEANO E CAMADA ALANTOIDEANA EM SUA TOTALIDADE

Para a altura da camada do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana, foram estimadas por meio de mensuração direta da micrografia de objetiva de menor aumento (2X), utilizando o software *Image J*®. Em cada lâmina, foram utilizadas 5 regiões randomizadas (Figura 4).

Figura 4 – Determinação da Altura da Camada do córion (A), Mesoderma alantoideano (B) e Camada alantoideana (C) de cada região placentária equina, utilizando o programa Image J®. Coloração HE. Barra de escala = 500 µm



Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Análise estatística

Os dados foram tratados pelo aplicativo *Guided Data Analysis*, primeiramente testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade

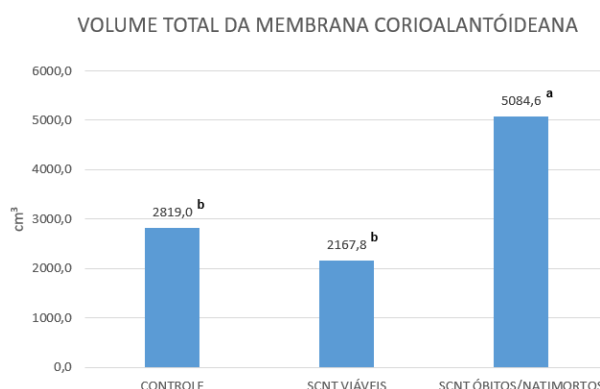
das variâncias. Caso não respeitadas estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e, no caso da normalidade não obtida, empregou-se, o teste de Wilcoxon. Para as variáveis paramétricas foi utilizado o teste t de Student. Foi considerada a probabilidade de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

VOLUME TOTAL DA MEMBRANA CORIOALANTOIDEANA

O grupo SCNT óbitos/natimortos apresentou média superior do volume total da membrana corioalantoideana quando comparado aos grupos Controle e SCNT viáveis, onde ambos não obtiveram diferença estatística com $p=0.0003$ (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Volume total em cm^3 da membrana corioalantoideana no grupo Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos

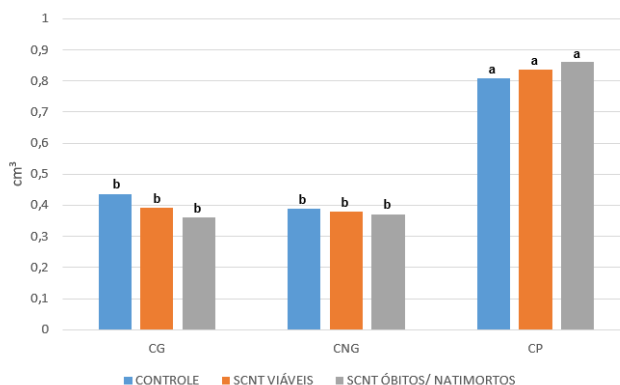


Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

VOLUME DAS REGIÕES PLACENTÁRIAS

Quando comparamos o efeito da região em cada grupo, observamos que em todos os grupos na região CP obteve valores superiores (Controle: $0,80852 \pm 0,59$); SCNT viáveis: $0,83631 \pm 0,03$; SCNT óbitos/ natimortos: $0,85977 \pm 0,03$) em relação ao CG (Controle: $0,43660 \pm 0,03$; SCNT viáveis: $0,39130 \pm 0,02$; SCNT óbitos/ natimortos: $0,35977 \pm 0,02$) e CNG (Controle: $0,38849 \pm 0,03$; SCNT viáveis: $0,38003 \pm 0,01$; SCNT óbitos/ natimortos: $0,36988 \pm 0,01$) (Gráfico 2).

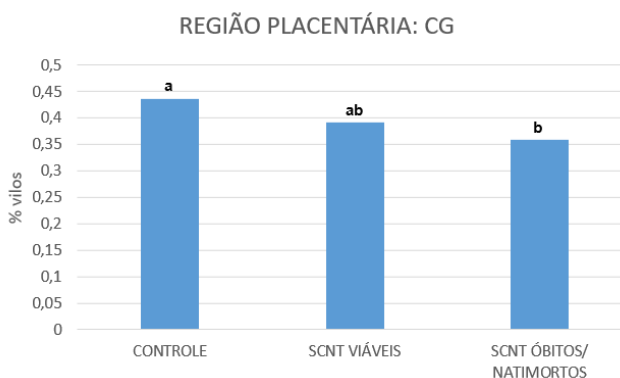
Gráfico 2 – Volume total em cm³ das regiões placentárias entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos, nos macrocompatimentos de corno gravídico (CG), corno não gravídico (CNG) e corpo do útero (CP)



Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Já quando comparamos o efeito do grupo em cada região, o CG do grupo SCNT óbito/natimorto obteve valores inferiores ($0,35977 \pm 0,27$) de volume no foco amostral em questão quando comparado ao grupo Controle ($0,43660 \pm 0,34$), e o grupo SCNT viáveis ($0,39130 \pm 0,02$) não se diferiu estatisticamente dos demais grupos experimentais (Gráfico 3).

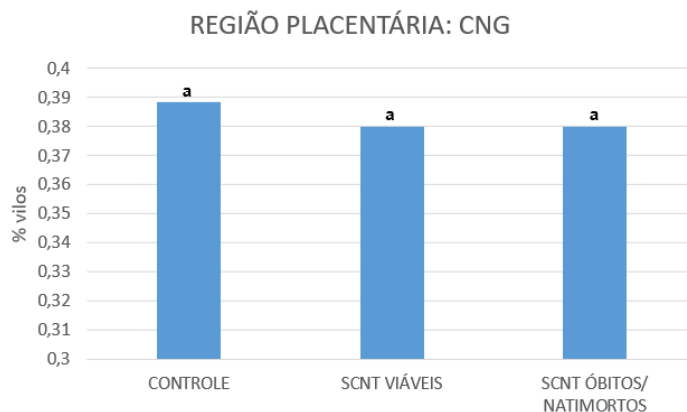
Gráfico 3 – Volume total em % de vilos das regiões placentárias no macrocompatimento de corno gravídico (CG) entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos



Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

A região CNG não apresentou diferenças estatísticas quando comparados os grupos Controle ($0,38849 \pm 0,03$), SCNT viáveis ($0,38003 \pm 0,01$) e SCNT óbito/natimorto ($0,36988 \pm 0,01$) (Gráfico 4).

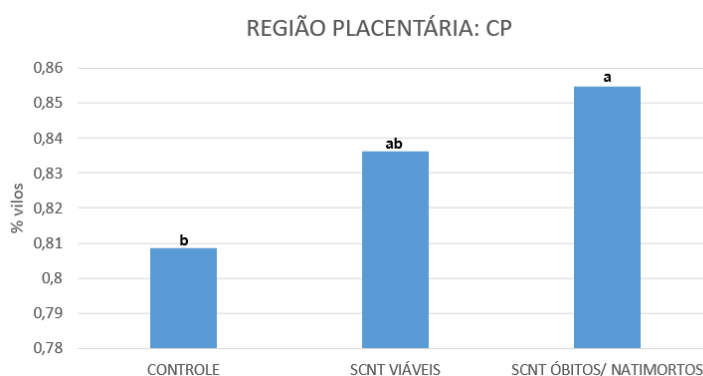
Gráfico 4 – Volume total em % de vilos das regiões placentárias no macrocompatimento de corno não gravídico (CNG) entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos



Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Na região CP, o grupo SCNT óbito/natimorto obteve valores maiores ($0,85483 \pm 0,03$) de volume em comparado ao grupo Controle ($0,80852 \pm 0,05$), e o grupo SCNT viáveis ($0,83631 \pm 0,03$) não se diferiu estatisticamente dos demais grupos (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Volume total em % de vilos das regiões placentárias no macrocompatimento de corpo do útero (CP) entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos



Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

DENSIDADE, ALTURA E LARGURA DOS MICROCOTILÉDONES

Na avaliação das variáveis Densidade, e Largura dos microcotilédones os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos, apresentaram nas regiões de CG, CNG e CP os seguintes resultados (Tabela 1).

Tabela 1 – Média \pm erro padrão com valor de p das variáveis Densidade, Altura e Largura dos microcotilédones nos grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos

VARIÁVEIS	GRUPO EXPERIMENTAL			VALOR DE p
	CONTROLE	SCNT VIÁVEIS	SCNT ÓBITOS/ NATIMORTOS	
DENS (UN/ μ m)	22,400 \pm 8,50	13,933 \pm 9,95	13,600 \pm 5,16	0,7453
ALT (μ m)	843,511 \pm 193,28	883,713 \pm 286,40	984,560 \pm 411,56	0,0033
LARG (μ m)	507,953 \pm 101,05	371,180 \pm 161,15	563,960 \pm 154,50	0,7110

DENS: Densidade; UN/ μ m: Unidade por comprimento em micrometro.

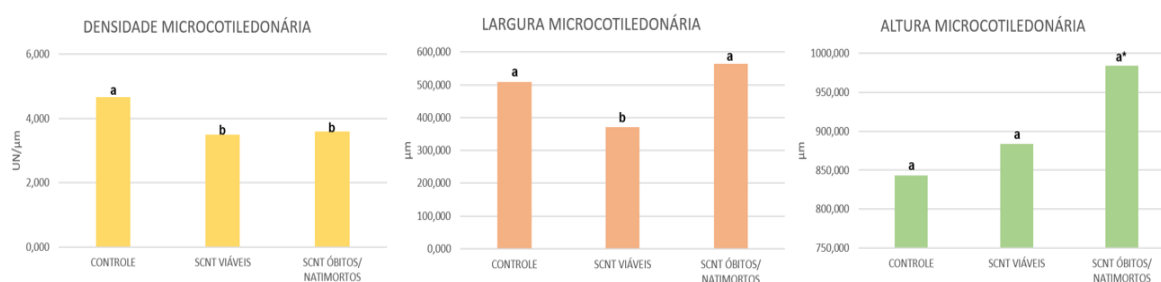
ALT: Altura; μ m: micrometro.

LARG: Largura; μ m: micrometro.

Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

Uma menor Densidade microcotiledonária foi constatado no grupo SCNT óbitos/ natimortos (13,600 \pm 5,16) em relação ao grupo Controle (22,400 \pm 8,50) e SCNT viáveis (13,933 \pm 9,95). O grupo SCNT viáveis (371,180 \pm 161,15) demonstrou possuir menor Largura dos microcotilédones em comparação aos grupos Controle (507,953 \pm 101,05) e SCNT óbitos/ natimortos (563,960 \pm 154,50). Na variável Altura microcotiledonária, o grupo SCNT apresentou uma tendência de aumento quando comparado com os grupos Controle e SCNT viáveis – 843,511 \pm 193,28 e 883,713 \pm 286,40, respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Densidade, Largura e Altura dos microcotilédones entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos



Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Asterisco indica tendência de aumento.

UN/ μ m: Unidade por comprimento em micrometro.

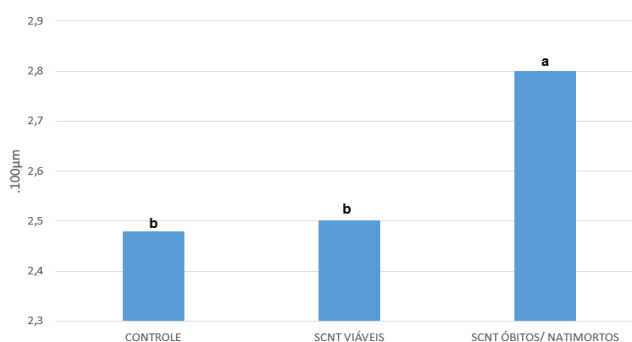
μ m: micrometro.

Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

ALTURA DA CAMADA DO CÓRION, MESODERMA ALANTOIDEANO E CAMADA ALANTOIDEANA EM SUA TOTALIDADE

A somatória das camadas do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana contrastado com os grupos experimentais, o grupo SCNT óbitos/natimortos ($723,273 \pm 386,55$) apresentou maior altura das camadas em relação ao grupo Controle ($354,753 \pm 203,10$) e SCNT viáveis ($368,806 \pm 219,69$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Altura da camada do córion, mesoderma alanteoideano e camada alantoideana em sua totalidade, entre os grupos Controle, SCNT viáveis e SCNT óbitos/ natimortos



Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: CARNEIRO, FP (2022).

DISCUSSÃO

A placenta dos animais há muitos anos vem sendo estudada pois fornece um “imprinted”, ou seja, dispõe de uma retrospectiva de todos os acontecimentos no período gestacional. Nesta perspectiva, devido ao transcorrer gestacional, modificações procedem nos padrões nutricionais, vasculares e endócrinos, surgindo alterações tanto nas estruturas macroscópicas quanto ultraestruturais da placenta (SIBLEY et al., 2005; FOWDEN et a., 2006). No entanto, alterações que ultrapassem limites fisiológicos podem comprometer o período gestacional e desenvolvimento fetal, resultando em animais com algum tipo de déficit, abortamentos, natimortos ou óbitos neonatais.

Em nosso estudo descobrimos que, o grupo SCNT óbitos/ natimortos obteve menor densidade microcotiledonária (em comparação ao grupo controle) associada uma tendência de aumento na altura das vilosidades. Esse mecanismo de avanço viloso em direção ao endométrio, poderia caracterizar uma tentativa de aumentar a área de troca entre os tecidos fetais e maternos, em razão da quantidade reduzida de microcotilédones – única estrutura capaz de realizar as transferências moleculares

necessárias para o desenvolvimento fetal. Corroborando com nossos achados, Bianco et al., (2014) fazem uma correlação entre placentas de éguas provenientes de gestações de animais convencionais com a viabilidade neonatal onde explicam que o desenvolvimento placentário de éguas está relacionado com a saúde do potro, apontando ainda que, mediante análise morfológica, as vilosidades coriônicas tendem a ter maior ramificação e complexidade em potros doentes do que em potros saudáveis.

O grupo SCNT óbitos/ natimortos ainda, demonstrou maior volume total da membrana corioalantóide onde, dentre as regiões de corno gravídico, corno não gravídico e corpo do útero, esta última apresentou maior volume quando comparado aos demais grupos. O maior volume de CP pode ser baseado na maior altura das camadas do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana na mesma região placentária. Esse aumento do volume e altura provavelmente refere-se a um processo inflamatório das membranas embrionárias durante o período gestacional, tipificado por placentite, enfermidade que é a causa mais comum de abortamento, parto prematuro e morte neonatal nos equinos (HONG et al., 1993).

Todavia, a origem das alterações placentárias podem ocorrer por mecanismos tanto maternos quanto fetais.

Um estudo realizado em mulheres gestantes portadoras de diabetes, mostrou que a placentite influencia o recrutamento de citocinas pró-inflamatórias que resultam em um aumento dos componentes da matriz extracelular e subsequente vascularização e reorganização estrutural placentária (RADAELLI et al., 2003). Já em mulheres com pré-eclampsia, há uma diminuição da perfusão placentária, resultando em falha na invasão do trofoblasto em direção ao endométrio. Como resposta, há alteração na função endotelial, ativando o processo inflamatório e reatividade vascular. Nesse cenário desfavorável, com o fluxo útero-placentário diminuído, há a instalação da insuficiência placentária (MAYHEW et al., 2003). Fatores virais, no caso de mulheres infectadas com SARS-CoV-2, aumentam o risco de pré-eclampsia, parto prematuro, sofrimento fetal, má perfusão vascular materna e fetal, anormalidades placentárias resultantes de resposta imunológica localizada (BRIEN et al., 2021; GUPTA et al., 2021; HUSEN et al., 2021).

No tocante da incompetência embrionária em SCNT, na espécie bovina foi demonstrado uma expressão errônea de genes e anormalidade do complexo de histocompatibilidade do tipo I no trofoblasto (HILL et al., 2002; BORDINGNON et al.,

2002, 2003). Em cães, a clonagem ocasionalmente promove uma anormalidade genômica no desenvolvimento sexual, onde células doadoras masculinas produzem filhotes clonados com genitália externa feminina e completa disgenesia gonadal masculina (HWANG et al., 2020). Em camundongos, demonstraram baixas taxas de proliferação das células trofoblásticas, genes *Sfmbt2*, *Gab1* e *Slc38a4* que são expressos paternalmente, e em placentas SCNT eles foram expressos bialeticamente (INOUE et al., 2020). Os maiores desafios em relação ao desenvolvimento embrionário clonado nas espécies, estão na reprogramação epigenética, implantação, desenvolvimento e função placentária (NIEMANN et al., 2016; OLSSON et al., 2022; MALIN et al 2022).

Nos programas de reprodução equina, com frequência, as éguas selecionadas não são realizadas acurácias para investigar possíveis alterações sistêmicas que podem impactar o desenvolvimento embrionário, e durante o período gestacional, é verificado apenas a viabilidade do feto,

Neste estudo não tivemos acesso ao histórico das enfermidades acometidas pelas éguas durante o período gestacional ou nas gestações progressas. Recentemente Pazinato et al., (2017), demonstraram que em éguas gestantes com laminite crônica apresentaram sinais de síndrome hipertensiva e alterações vasculares nos vasos placentários, como redução do lúmen vascular e da área capilar nas microcotiledones e espessamento da parede vascular. Confirmaram ainda que potros nascidos de éguas com laminite crônica apresentaram menor peso ao nascer e menor duração da gestação.

Neste sentido, esta pesquisa levanta uma questão importante a respeito da saúde da égua gestante e seu impacto sobre o desenvolvimento fetal, demonstrando que, a eficiência da técnica não depende exclusivamente do embrião, mas sim de um conjunto de fatores materno-fetais que podem ser levados em consideração. Uma vez que as éguas tem um período gestacional longo (média de 340 dias), a chance de acometimento de alguma enfermidade é razoavelmente possível, da mesma forma a resolução da mesma sem o conhecimento veterinário.

Notável e decisivo em qualquer estação reprodutiva e de nascimento, é a instauração de exames obstétricos periodicamente na gestante equina além do manejo sanitário, parasitário e nutricional adequados. A saúde materna, fetal e do potro dependem desse período crítico de modificações celulares. O nascimento do potro é uma parte do processo.

Em locais onde é realizado o exame pós delivramento da membrana corioalantoideana e anexos fetais, é possível fazer a averiguação macroscópica das estruturas, uma vez placentárias, e correlacionar com plausíveis medidas de suporte ao neonato equino. A instituição do exame da membrana corioalantóideana é de extrema importância para a clínica do potro, além da clínica e saúde reprodutiva da égua.

Por essa razão, acreditamos que mais estudos são necessários a respeito das anormalidades placentárias, seus impactos na saúde fetal e a verificação das condições fisiológicas da égua candidata ao programa de reprodução, durante o período gestacional e os devidos cuidados pós-parto para o restabelecimento da saúde reprodutiva das éguas.

CONCLUSÃO

O grupo SCNT óbitos/ natimortos obteve maior volume total da membrana corioalantoideana; maior volume na região de corpo do útero e menor na região de corno não gravídico; maior altura na totalidade das camadas do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana. Demonstrou ainda, uma tendência de alta na Altura dos vilos quando comparado ao grupo Controle.

O grupo SCNT viáveis apresentou valores da Largura dos microcotilédones inferiores em comparação ao grupo Controle.

Em ambos os grupos SCNTs, demonstraram possuir menor Densidade microcotiledonária em relação ao grupo Controle.

Ressaltamos que, mais pesquisas são necessárias para a construção do conhecimento acerca das anormalidades placentárias em clones equinos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES (Processo 88887.503458/2020-00) pela concessão de bolsa, à FAPESP (nº 2020/10260-3) pelo financiamento deste projeto de pesquisa. Obrigada à Dra. Mariana Abreu Redoan, Dra. Juliana Izzo Octaviano e Dra. Thaís Naomi Gonçalves Nesiya juntamente à todas as estagiárias pela ajuda na coleta do material biológico.

REFERÊNCIAS

ABEDZADEH-KALAHROUDI, M. et al. Maternal and neonatal outcomes of pregnant patients with COVID-19: A prospective cohort study. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 153, n. 3, p. 449-456, jun. 2021.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*, 123(3):445–53, 2002.

ASBURY, A.C.; LeBLANC, M.M. The placenta. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Pennsylvania: Lea & Febiger, p.509-516. 1993.

BARKER, D. J. P., et al. Growth In Utero, Blood Pressure In Childhood And Adult Life, And Mortality From Cardiovascular Disease. *BMJ: British Medical Journal*, vol. 298, no. 6673, 1989.

BARKER, D. J. P. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*, 1(9):418–23, 1995.

BARKER, D. J. P. Chronic disease in humans originates in the intra-uterine environment. *Anim Reprod Sci.*, 94(1–4):343–54, 2006.

BRIEN, M. E. et al. Pandemic stress and SARS-CoV-2 infection are associated with pathological changes at the maternal-fetal interface. *Placenta*, v. 115, p. 37-44, nov. 2021.

BIANCO, C. et al. Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from healthy and sick foals. *Theriogenology*, v. 82, n. 8, p. 1106- 1112.e1, 2014.

BORDINGNON, V.; SMITH, L. "Clonagem animal por transferência nuclear" In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, P. 281-303, 2002.

BORDINGNON, V. "Clonagem de animais por transferência nuclear: Avanços e desafios". *Acta Scientiae Veterinarie. Supl.* 31, P. 64-73, 2003.

BUKOWSKI, R; HANSEN, NI; PINAR, H; WILLINGER, M; REDDY, UM; PARKER, CB, et al. Altered fetal growth, placental abnormalities, and stillbirth. *PLoS ONE*, 12(8):e0182874, 2017.

FOWDEN, A.L.; WARD, J.W.; WOODING, F.P.; FORHEAD, A.J.; CONSTANCIA, M. Programming placental nutrient transport capacity. *J Physiol.* Apr 1;572(Pt 1):5-15, 2006.

GAMBINI, A.; MASERATI, M. A journey through horse cloning. *Reprod Fertil*, Jan;30(1):8-17, 2017.

GUPTA, P.; KUMAR, S.; SHARMAR, S. S. SARS-CoV-2 prevalence and maternal-perinatal outcomes among pregnant women admitted for delivery: Experience from COVID-19-dedicated maternity hospital in Jammu, Jammu and Kashmir (India). *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 9, p. 5505-5514, set. 2021.

HAGHIGHI, L; JAHANSHAHI, F. Two knots is an umbilical cord seventy centimeter length: a case report. *Clinical Case Report.*, 8: 1579- 1581, 2020.

HAMMA, IA; BLUE, NR; ALLSHOUSE, AA et al. Umbilical cord abnormalities and stillbirth. *Obstetrics & Gynecology*, 135: 644 – 652, 2020.

HILL, J.R.; SCHLAFER; D.H.; FISHER; P.J.; DAVIES, C.J. "Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response¹". *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 55–63, 2002.

HONG, C.B.; DONAHUE, J.M.; GILES, R.C. et al. Etiology and pathology of equine placentitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 5 (1): 56-63, 1993.

HUSEN, M. F. et al. Unique severe COVID-19 placental signature independent of

severity of clinical maternal symptoms. *Viruses*, v. 13, n. 8, p. 1670, ago. 2021.

HWANG, K.C.; CHOI, Y.K.; JEONG, Y. I.; PARK, K. B. et al. Demetylation of the sex-determining region Y gene promoter and incidence of disorder of sex development in cloned dog males. *J Physiol Pharmacol.*, Apr;71(3), 2020.

INOUE, K. et al. Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfbmt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas. *Nat Commun.*, 11, p. 2150, 2020.

JOHNSON, A. K. et al. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 236, n. 9, p. 983–990, 2010.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; PONDERATO, N.; TURINI, P.; CROTTI, G.; GALLI, C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction.*, Oct;130(4):559-67, 2005.

MALIN, K.; WITKOWSKA-PITASZEWICZ, O.; PAPIS, K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. *Theriogenology*, p.246-254, Vol. 189, Sept., 2022.

MAN, J; HUTCHINSON, JC; HEAZELL, AE; ASHWORTH, M; JEFFREY, I; SEBIRE, NJ. Stillbirth and intrauterine fetal death: role of routine histopathological placental findings to determine cause of death. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 48(5): 579-584, 2016.

MAYHEW TM. Patterns of villous and intervillous space growth in human placentas from normal and abnormal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 68(1-2):75-82, 1996.

MAYHEW TM, OHADIKE C, BAKER PN, CROCKER IP, MITCHELL C, ONG SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-

eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta*. Feb-Mar;24(2-3):219-26, 2003.

MAYHEW TM, MANWANI R, OHADIKE C, WIJESEKARA J, BAKER PN. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: studies on exchange surface areas, diffusion distances and villous membrane diffusive conductances. *Placenta*. Feb-Mar;28(2-3):233-8, 2007.

MAYHEW TM, JENKINS H, TODD B, CLIFTON VL. Maternal asthma and placental morphometry: effects of severity, treatment and fetal sex. *Placenta*. Apr;29(4):366-73, 2008.

MEIRELLES, M. G. et al. Qual o papel placentário e materno no desenvolvimento de potros equinos? *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p. 68-73, 2017.

OLSSON, P.O.; JEONG, Y.W.; JEONG, Y. et al. Insights from one thousand cloned dogs. *Sci Rep*. Jul 1;12(1):11209, 2022.

NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology*, 86, p. 80-90, 2016.

POLLACK, R. N.; DIVON, M. Y. Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology. *Clinical obstetrics and gynecology*, v. 35, n. 1, p. 99-107, 1992.

POZOR, M. A. et al. Placental abnormalities in equine pregnancies generated by SCNT from one donor horse. *Theriogenology*, v. 86, n. 6, p. 1573–1582, 2016.

RADAELLI, T.; VARASTEHPUR, A.; CATALANO, P. et al. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways *Diabetes*, 52, 2003.

ROBERTS, DJ; OLIVA, E. Clinical significance of placental examination in perinatal medicine. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.*, 5: 255 – 264, 2006.

SALAZAR-PETRES, E.; PEREIRA-CARVALHO, D.; LOPEZ-TELLO, J.; SFERRUZZI-PERRI, A. N. Placental structure, function, and mitochondrial phenotype relate to fetal size in each fetal sex in mice†. *Biol Reprod.*, Jun 13;106(6):1292-1311, 2022.

SAMUELSEN, G. B.; PAKKENBERG, B.; BOGDANOVIĆ, N.; GUNDERSEN, H. J. G.; LARSEN, J. F.; GRÆM N.; et al. Severe cell reduction in the future brain cortex in human growth-restricted fetuses and infants. *Am J Obstet Gynecol.*, 197(1):56.e1-56.e7, 2007.

TOLOSA, E.M.C. et al. Manual de técnicas para histología normal e patológica. 2.ed. São Paulo: Manole, 2003.

VAKIL, P.; HENRY, A.; CRAIG, M. E.; GOW, M. L. A review of infant growth and psychomotor developmental outcomes after intrauterine exposure to preeclampsia. *BMC Pediatr.*, Aug 30;22(1):513, 2022.

VERAS, M. M.; DAMACENO-RODRIGUES, N. R.; CALDINI, E. G.; MACIEL RIBEIRO, A. A.; MAYHEW, T. M.; SALDIVA, P. H.; DOLHNIKOFF, M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod.*, Sep;79(3):578-84, 2008.

5 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que, a semelhança entre o grupo SCNT viáveis e Controle foi maior quando comparado ao SCNT óbitos/ natimortos. Dado evidenciado com ressalva do corno não gestante à histologia, que apresentou desorganização tecidual e celular que, pode não ter afetado o desenvolvimento do feto ou outra área conseguiu suprir o déficit. No total as estruturas da membrana corioalantoideana – arranjo das vilosidades e progressão das estruturas em direção ao endométrio materno, sem acareações no epitélio trofoblasto, podem fundamentar como elementos favoráveis ao desenvolvimento placentário do grupo SCNT viáveis, corroborando com a viabilidade fetal encontrada. Diversos estudos realizados em humanos revelam que o trofoblasto se ramifica em determinados graus de plasticidade em direção ao miométrio na função de promover maior capacidade de vascularização, com capacidade de remodelamento dos vasos fetais e desenvolvimento dos vilos na placenta (KAUFMANN *et al.*, 2003; BARKER, 1995; (BARKER *et al.*, 1989; BARKER, 1995; SAMUELSEN *et al.*, 2007; VAKIL *et al.*, 2022).

Todavia, o grupo SCNT óbito/ natimortos apresentou menor densidade microcotiledonária (em comparação ao grupo controle) associada uma tendência de aumento na altura das vilosidades, alta quantidade dos vilos por microcotilédone em todas as regiões placentária de CG, CNG e CP, como uma maneira compensatória de intensificar e aumentar as trocas materno-fetais a fim de manter a gestação a termo. Um estudo realizado em placentas de potros saudáveis e doentes constatou que, a morfometria das vilosidades de potros doentes tendem a ter uma maior complexidade e ramificação em direção ao endométrio quando comparado a placentas advindas de potros saudáveis (BIANCO *et al.*, 2014).

Acrescido aos achado acima, o grupo SCNT óbitos/natimortos ainda expressaram uma maior contagem de células binucleadas. De acordo com Heyman *et al.* (2002), as células binucleadas secretam altas concentrações da proteína PSP60 em bovinos oriundos de SCNT. A alta concentração dessa proteína está relacionada ao aumento da atividade placentária, indicativo do desenvolvimento anormal placentário com o intuito de efeito compensatório, reforçando a nossa hipótese.

Análogo ao descoberto por Verechia *et al.*, (2003), nossos resultados também demonstraram que os animais provenientes de SCNT apresentaram células

troblásticas com núcleos modificados e uma desorganização estrutural tecidual placentária.

A condição de inflamação da placenta - a placentite pode ser encontrada de forma macro (com espessamento da membrana corioalantoide) e micro (pelo grau de infiltrado inflamatório nas regiões placentária, sobretudo no corpo do útero) nos grupos SCNTs, com ênfase no grupo SCNT óbitos/ natimortos, onde essa enfermidade é a causa comum de morte neonatal, parto prematuro e abortamento em equinos (HONG et al., 1993).

Uma camada de material/ substância desconhecido foi identificado, de forma parcial no grupo SCNT óbitos/ natimortos, e total no grupo SCNT viáveis, revestindo os vilos. Esse revestimento altera a morfologia do clássico formato de “amora”, podendo afetar as trocas materno-fetais. De acordo com Allen e Wilsher (2003), nos espaços adjacentes dos microcotilédones, as áreas de aréolas continuam presentes e funcionais até o fim gestacional, a fim de continuar a oferta de histotrofo para o feto. Porém, recente pesquisa realizada em placentas bovinas de SCNT esclarecem que, as células trofoblásticas tem função imunorreguladoras e aplicadoras de reposta imunes uterinas, onde em gestações incompatíveis heterozigóticas MHC-I expressaram níveis de citocinas pró-inflamatórias aumentadas na interface materno-fetal (RUTIGLIANO et al., 2022). Por isso, mais estudos investigativos são necessários a fim de esclarecer a composição dessa camada ou substância encontrada nos grupos de clones equinos.

Contudo, a origem das alterações placentárias podem ocorrer por mecanismos tanto maternos quanto fetais, e nesse sentido, frequentemente as éguas integrantes de programas reprodutivos não passam por uma avaliação fisiológica total, restritas apenas ao exame do sistema reprodutivo. Pazinato e colaboradores (2017), evidenciaram que em éguas gestantes com laminite crônica apresentaram sinais de síndrome hipertensiva e alterações vasculares nos vasos placentários, com redução do lúmen vascular e da área capilar nas microcotiledones e espessamento da parede vascular. Afirmaram então que potros nascidos de éguas com laminite crônica apresentaram menor peso ao nascer e menor duração da gestação.

Ressaltamos aqui, a importância de exames obstétricos e clínicos a respeito da saúde e condições fisiológicas da égua gestante, pois impacta de forma direta a estruturação e morfologia placentária e conseqüentemente o desenvolvimento fetal.

Diante do exposto, acreditamos que mais pesquisas são necessárias a fim da melhor compreensão dos processos de anormalidades placentárias em clones equinos, tomando igualmente como elemento decisivo para o bom andamento da gestação e nascimento de potros saudáveis - objetivo de qualquer programa reprodutivo, as condições de saúde das éguas gestantes.

.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho buscamos compreender as estruturas e arquitetura da membrana corioalantoideana de gestações advindas de SCNT viáveis e SCNT óbitos/natimortos com gestações de técnicas reprodutivas convencionais (Transferência Embrionária e Inseminação Artificial), que justificassem ou explicassem, em parte, as alterações placentárias e as perdas gestacionais.

No grupo SCNT viáveis observamos um desarranjo estrutural no corno não gestante que pode não ter impactado de forma direta o desenvolvimento e viabilidade do feto durante o período gestacional.

Por meio da análise estereológica o grupo SCNT óbitos/natimortos obtiveram maiores altura e volumes da membrana corioalantóide, com ênfase na região de corpo do útero. Este mesmo grupo experimental ainda, em análise histológica demonstrou uma intensa vascularização, principalmente na região do corpo do útero, onde analisada as ultraestruturas, apresentou um epitélio trofoblasto avariado, com a exposição dos capilares fetais dos vilos microcotiledonários e o extravasamento sanguíneo fetal. O grupo SCNT óbitos/natimortos manifestou possuir uma desordem nas estruturas integrantes da membrana corioalantóide dos vilos, camada do córion, mesoderma alantoideano e camada alantoideana.

Em ambos os grupos SCNTs pudemos verificar a presença de uma fina camada recobrimo de forma parcial ou total as vilosidades microcotiledonárias. Essa camada ou substância necessita de estudos mais específicos para apuração das causas ou mecanismos responsáveis pelo fenômeno.

Os programas de reprodução equina necessitam instituir protocolos a respeito da saúde geral das éguas candidatas ao processo e gestantes, a fim de levar a termo um potro saudável.

REFERÊNCIAS

ABD-ELNAEIM, M. M. M.; DERAR, I. R.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R.; LEISER, R.; SCHULER, G. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors α and β , progesterone receptor and aromatase in the equine placenta. *Reprod Domest Anim.*, 44(2):312–9, 2009.

ALEMAN, M.; MCCUE, P. M.; CHIGERWE, M.; MADIGAN, J.E. Plasma concentrations of steroid precursors, steroids, neuroactive steroids, and neurosteroids in healthy neonatal foals from birth to 7 days of age. *J Vet Intern Med.*, Sep;33(5):2286-2293, 2019.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*, 123(3):445–53, 2002.

ANDERSON, C. M.; LOPEZ, F.; ZHANG, H-Y.; PAVLISH, K.; BENOIT, J. N. Reduced Uteroplacental Perfusion Alters Uterine Arcuate Artery Function in the Pregnant Sprague-Dawley Rat¹. *Biol Reprod.*, 72(3):762–6, 2005.

ANDERSON, C. M.; LOPEZ, F.; ZIMMER, A.; BENOIT, J. N. Placental Insufficiency Leads to Developmental Hypertension and Mesenteric Artery Dysfunction in Two Generations of Sprague-Dawley Rat Offspring¹. *Biol Reprod.*, 74(3):538–44, 2006.

AKAGI, S.; MATSUKAWA, K.; TAKAHASHI, S. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in Cattle. *J Reprod Dev.*, 60(5):329-35, 2014.

ARNOLD, D. R.; FORTIER, A. L.; LEFEBVRE, R.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; SMITH, L. C. Placental Insufficiencies in Cloned Animals - A Workshop Report. *Placenta*, 29(SUPPL.):108–10, 2008.

ASBURY, A. C.; LEBLANC, M. M. The placenta. *Equine Reproduction*. Cap. 60, 509-516, 1993.

BANKS, W. J. *Histologia veterinária aplicada*, 2ed. São Paulo: Manole Ltda, p. 579-584, 1992.

BARKER, D. J. P., et al. Growth In Utero, Blood Pressure In Childhood And Adult Life, And Mortality From Cardiovascular Disease. *BMJ: British Medical Journal*, vol. 298, no. 6673, 1989.

BARKER, D. J. P.; BULL, A. R.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S. J. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br Med J.*, 301(6746):259–62, 1990.

BARKER, D. J. P. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*, 1(9):418–23, 1995.

BARKER, D. J. P. Chronic disease in humans originates in the intra-uterine environment. *Anim Reprod Sci.*, 94(1–4):343–54, 2006.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. Clonagem animal por transferência nuclear. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Varela, p. 347-364, 2008.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, Mar 7;380(6569):64-6, 1996.

CAPELLINI, I. The evolutionary significance of placental interdigitation in mammalian reproduction: contributions from comparative studies. *Placenta*, Oct;33(10):763-8, 2012.

CHAVATTE-PALMER, P.; CAMOUS, S.; JAMMES, H.; LE, CLEAC'H N.; GUILLOMOT, M.; LEE, R. S. F. Review: Placental perturbations induce the

developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*, 33(SUPPL.):S99–104, 2012.

DANTZER, V.; Epitheliochorial Placentation. In: KNOBIL, E., NEILL, J. D. *Encyclopedia of reproduction*, San Diego: Academic Press, v. 2, p. 18-28, 1999.

DE SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, LE.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of Gestational Deficiencies in Cloned Sheep Fetuses and Placentae. *Biol Reprod*, 65(1):23–30, 2001.

DICKEY, E. J.; LONG, S. N.; HUNT, R. W. Hypoxic Ischemic Encephalopathy-What Can We Learn from Humans? *J Vet Intern Med*, 25(6):1231–40, 2011.

FEDORKA, C. E.; BALL, B. A.; WALKER, O. F.; CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; LU, K. G.; HANNEMAN, J. M.; TROEDSSON, M. H. T.; ADAMS, A. A. Alteration of the mare's immune system by the synthetic progestin, altrenogest. *Am J Reprod Immunol.*, Aug;82(2):e13145, 2019.

FERNANDEZ-TWINN, D.S.; HJORT, L.; NOVAKOVIC, B.; OZANNE, S. E.; SAFFERY, R. Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. Oct;62(10):1789-1801, 2019.

FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V. J.; GONCALVES, P.B. D. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo- SP. Varela, 408 p., 2011.

GALLI, C. et al. A cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v. 424, p. 635, 2003.

GALVIN, N.; COLLINS, D. Perinatal asphyxia syndrome in the foal: Review and a case report. *Ir Vet J*, 57(12):707–14, 2004.

GAMBINI, A.; JARAZO, J.; OLIVERA, R.; SALAMONE, D. F. Equine Cloning: In Vitro and In Vivo Development of Aggregated Embryos¹. *Biol Reprod.*, 87(1):1–9, 2012.

GAMBINI, A.; MASERATI, M. A journey through horse cloning. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, p. 8–17, 2018.

GAO, Y.; HYTTEL, P.; HALL, V. J. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. *Mol Reprod Dev.*, Jun;77(6):540-9, 2010.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* 117; 143-152, 1999.

GLANZNER, W. G.; DE MACEDO, M. P.; GUTIERREZ, K.; BORDIGNON, V. Enhancement of Chromatin and Epigenetic Reprogramming in Porcine SCNT Embryos-Progresses and Perspectives. *Front Cell Dev Biol.*, Jul 11;10:940197, 2022.

GUIMARÃES, C.A.; MEIRELLES M.G.; FERNANDES C.B. Eficiência placentária na espécie equina: quais fatores podem estar relacionados? *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v.52, n.2, p. 98-105, 2015.

HUGHES, J. P. Reproductive Biology of the Mare — Basic and applied aspects. *Theriogenology*, 13(2):113, 1980.

JOHNSON, A. K. et al. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 236, n. 9, p. 983–990, 2010.

JOHNSON, P. J.; WIEDMEYER, C. E.; MESSER, N. T.; GANJAM, V. K. Medical implications of obesity in horses - Lessons for human obesity. *J Diabetes Sci Technol.*, 3(1):163–74, 2009.

JONES, H. N.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Regulation of Placental Nutrient Transport - A Review. *Placenta*, 28(8–9):763–74, 2007.

KRETSCHMER, T.; TURNWALD, E. M.; JANOSCHEK, R.; WOHLFARTH, M.; HANDWERK, M.; DÖTSCH, J.; HUCKLENBRUCH-ROTHER, E.; APPEL, S.

Treatment of high fat diet-induced obese pregnant mice with IL-6 receptor antibody does not ameliorate placental function and fetal growth restriction. *Am J Reprod Immunol.*, Jul;88(1):e13564, 2022.

LAGUTINA, I. et al. Somatic cell nuclear transfer in horses: Effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, v. 130, n. 4, p. 559–567, 2005.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: In a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, v. 102, n. 3, p. 122–134, 1994.

MALIN, K.; WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ, O.; PAPIS, K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. *Theriogenology*, Sep 1;189:246-254, 2022.

MASERATI, M.; MUTTO, A. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 41, p. 42–50, 2016.

MAYHEW, T. M. Stereology and the placenta: where's the point? - A review. *Placenta*, Apr;27 Suppl A:S17-25, 2006.

MAYHEW, T. M. A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies. *J Anat.*, Jul;215(1):77-90, 2009.

MEIRELLES, M. G. et al. Qual o papel placentário e materno no desenvolvimento de potros equinos? *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p. 68-73, 2017.

MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. *Vet J.*,168(2):118–33, 2004.

MEYBERG, R.; BOOS, R.; BABAJAN, A.; ERTAN, A. K.; SCHMIDT, W. Die intrauterine Wachstumsretardierung--Perinatale Mortalität und postnatale Morbidität an einem Perinatalzentrum [Intrauterine growth retardation--perinatal mortality and

postnatal morbidity in a perinatal center]. *Z Geburtshilfe Neonatol.*, Nov-Dec;204(6):218-23, 2000.

MIGLINO, M. A. Clonagem Animal e Pacentação. *Ciência e Cultura*, v. 56, p. 31–33, 2004.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; et al. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*, 68(4):604–17, 2007.

MORALES-RUBIO, R. A.; ALVARADO-CRUZ, I.; MANZANO-LEÓN, N.; ANDRADE-OLIVA, M. D.; URIBE-RAMIREZ, M.; QUINTANILLA-VEJA, B.; OSORNIO-VARGAS, Á.; DE VIZCAYA-RUIZ, A. In utero exposure to ultrafine particles promotes placental stress-induced programming of renin-angiotensin system-related elements in the offspring results in altered blood pressure in adult mice. *Part Fibre Toxicol.*, Jan 28;16(1):7, 2019.

MOSSMAN, H. W. Vertebrate fetal membranes. Rutgers University Press, New Brunswick. 383p. 1987.

MURUVI, W. et al. In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology*, v. 64, n. 6, 2005.

NI, W.; YOU, S.; CAO, Y.; LI, C.; WEI, J.; WANG, D.; QIAO, J.; ZHAO, X.; HU, S.; QUAN, R. Aberrant expression of miR-127, miR-21 and miR-16 in placentas of deceased cloned sheep. *Res Vet Sci.*, Apr;105:200-4, 2016.

OBACK, B.; WELLS, D. N. Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Mol Reprod Dev.*, 74:646–654, 2007.

OLIVERA, R. Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. *Stem Cells Cloning Adv Appl.*, 11:13–22, 2018.

PEUGNET, P.; ROBLES, M.; WIMEL, L.; TARRADE, A.; CHAVATTE-PALMER, P. Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. *Theriogenology*, Jul 1;86(1):99-109, 2016.

POLLACK, R. N.; DIVON, M. Y. Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology. *Clinical obstetrics and gynecology*, v. 35, n. 1, p. 99-107, 1992.

POZOR, M. A. et al. Placental abnormalities in equine pregnancies generated by SCNT from one donor horse. *Theriogenology*, v. 86, n. 6, p. 1573–1582, 2016.

REES, S.; HARDING, R.; WALKER, D. An adverse intrauterine environment: implications for injury and altered development of the brain. *Int J Dev Neurosci.*, 26(1):3–11, 2008.

REGNAULT, T. R. H.; GALAN, H. L.; PARKER, T. A.; ANTHONY, R. V. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. *Placenta*, v.23(Suppl A), p.119-129, 2002.

ROBLES, M.; PEUGNET, P.; DUBOIS, C.; PIUMI, F.; JOUNEAU, L.; BOUCHEZ, O.; AUBRIÈRE, M. C.; DAHIREL, M.; AOUN, J.; WIMEL, L.; COUTURIER-TARRADE, A.; CHAVATTE-PALMER, P. Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation. *Placenta*, Apr;64:44-52, 2018.

ROSER, J. F.; MEYERS-BROWN, G. Enhancing Fertility in Mares: Recombinant Equine Gonadotropins. *J Equine Vet Sci.*, Maio;76:6-13, 2019.

ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C.; CHAVATTE-PALMER, P. Readiness for birth: an endocrinological duet between fetal foal and mare. *Equine Vet J Suppl.*, 24(24):96–9, 1997.

SALAVATI, N.; et al. The possible role of placental morphometry in the detection of fetal growth restriction. *Frontiers in Physiology*, v. 10, n. JAN, 2019.

SALAZAR-PETRES, E.; PEREIRA-CARVALHO, D.; LOPEZ-TELLO, J.; SFERRUZZI-PERRI, A. N. Placental structure, function, and mitochondrial phenotype relate to fetal size in each fetal sex in mice†. *Biol Reprod.*, Jun 13;106(6):1292-1311, 2022.

SAMUELSEN, G. B.; PAKKENBERG, B.; BOGDANOVIĆ, N.; GUNDERSEN, H. J. G.; LARSEN, J. F.; GRÆM N.; et al. Severe cell reduction in the future brain cortex in human growth-restricted fetuses and infants. *Am J Obstet Gynecol.*, 197(1):56.e1-56.e7, 2007.

SECO, A. S. M. Origem fetal das doenças do adulto - revisitando a teoria de Barker. *Acta Obs ginecol Port.*, 3(3):158–68, 2009.

SEVOV, A. S. et al. Optimal villi density for maximal oxygen uptake in the human placenta. *Jornal of Theoretical Biology*, v. 364, p. 383-396, 2015.

SIBLEY, C. P.; TURNER, M. A.; CETIN, I.; AYUK, P.; BOYD, CAR.; D'SOUZA, S. W.; et al. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res.*, 58(5):827–32, 2005.

SRIRATTANA, K.; KANEDA, M.; PARNPAI, R. Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer. *Int J Mol Sci.*, Feb 10;23(4):1969, 2022.

STEVEN, D.H., SAMUEL, C.A. Placentation in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl. V.23*, p.580, 1975.

TANAKA, S.; ODA, M.; TOYOSHIMA, Y.; WAKAYAMA, T.; TANAKA, M.; YOSHIDA, N.; et al. Placentomegaly in Cloned Mouse Concepti Caused by Expansion of the Spongiotrophoblast Layer1. *Biol Reprod.*, 65(6):1813–21, 2001.

TOLSA, C. B.; ZIMINE, S.; WARFIELD, S. K.; FRESCHI, M.; ROSSIGNOL, A. S.; LAZEYRAS, F.; et al. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.*, 56(1):132–8, 2004.

VAALA, W. E. Perinatal Asphyxia Syndrome in Foals. *Curr Ther Equine Med Fifth Ed.*, 45:644–9, 2003.

VAHTER, M.; BROBERG, K.; HARARI, F. Placental and Cord Blood Telomere Length in Relation to Maternal Nutritional Status. *J Nutr.*, Oct 12;150(10):2646-2655, 2020.

VAKIL, P.; HENRY, A.; CRAIG, M. E.; GOW, M. L. A review of infant growth and psychomotor developmental outcomes after intrauterine exposure to preeclampsia. *BMC Pediatr.*, Aug 30;22(1):513, 2022.

VERAS, M. M.; DAMACENO-RODRIGUES, N. R.; CALDINI, E. G.; MACIEL RIBEIRO, A. A.; MAYHEW, T. M.; SALDIVA, P. H.; DOLHNIKOFF, M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod.*, Sep;79(3):578-84, 2008.

VERECHIA, F. T.; MIGLINO, M. A.; VISITIN, M. B.; MANSANO, J.; YAMASAKI, W.; AMBRÓSIO, C. E.; CARVALHO, A. F.; BRAGA, F. C.; SANTOS, T. C.; LEISER, R. Placentação em bovinos clonados: arquitetura microvascularização e estrutura. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003. Ribeirão Preto. Anais... [Ribeirão Preto]: [s. n.], 2003.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. *Theriogenology*, 58(2–4):833–5, 2002.

WOLLMANN, H. A. Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res.*, 49 Suppl 2:1-6, 1998.

WONG, D. M.; WILKINS, P. A.; BAIN, F. T.; BROCKUS, C. W. Neonatal encephalopathy in foals. *Compend Contin Educ Vet.*, 33(9):1–10, 2011.

WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. Nutrient transfer across the equine placenta: Correlation of structure and function. *Handb Environ Chem Vol 5 Water Pollut.*, 38(2):175–83, 2006.

WOODS, G. L. et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v. 301, n. 5636, p. 1063, 2003.

YANG, X. Q.; WU, Z. F.; LI, Z. C. Advances in epigenetic reprogramming of somatic cells nuclear transfer in mammals. *Yi Chuan*. Dec 20;41(12):1099-1109, 2019.