

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**IDENTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES PARA HORMÔNIO
LUTEINIZANTE, ESTRÓGENO E PROGESTERONA NO TRATO REPRODUTIVO
EXTRAGONADAL DA ÉGUA**

ANAMARIA TELLES ESMERALDINO

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: RODRIGO COSTA MATTOS

**PORTO ALEGRE
2012**

ANAMARIA TELLES ESMERALDINO

**IDENTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES PARA HORMÔNIO
LUTEINIZANTE, ESTRÓGENO E PROGESTERONA NO TRATO REPRODUTIVO
EXTRAGONADAL DA ÉGUA**

APROVADA POR:

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Orientador e Presidente da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo Costa Matos, por me abrir as portas do seu grupo de pesquisa e confiar no meu trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo Malschitzky, pelo precioso auxílio em todas as fases deste estudo, sempre disponível para ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

À Luisiane, que durante toda a sua residência, se propôs a desenvolver comigo a técnica de imunohistoquímica no laboratório de patologia da ULBRA e a me ajudar na leitura das lâminas como “fiel da balança”.

À professora Dra. Sandra Fiala, por me “inserir” e acompanhar no abatedouro, além de servir de “GPS” pelas ruas de Pelotas.

Ao Frigorífico Miramar, pela permissão das coletas nas éguas de abate.

À Dra. Andrea Keller, que veio prontamente me auxiliar na classificação das primeiras biópsias.

À Dra. Ana Maria Franco Gaiger e aos funcionários do Laboratório Patologistas Reunidos, pela ajuda com a técnica de imunohistoquímica.

Aos funcionários, bolsistas e alunos do Laboratório de Anatomia Patológica da ULBRA, em especial à Beatriz e Maira, pela preparação das lâminas.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS, pelo aporte financeiro para compra dos reagentes, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

À minha pequena e grande família, incluindo todos os meus amigos que me acompanham nesta e em outras jornadas.

À minha filha Letícia, meu marido Eduardo e minha mãe Yeda, seres iluminados que me transformaram em uma pessoa muito melhor.

RESUMO
IDENTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES PARA HORMÔNIO LUTEINIZANTE, ESTRÓGENO E PROGESTERONA NO TRATO REPRODUTIVO EXTRAGONADAL DA ÉGUA
Tese de Doutorado

Autor: Anamaria Telles Esmeraldino
Orientador: Rodrigo Costa Mattos

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença e a localização de receptores para hormônios esteróides e gonadotróficos, através da técnica de imunohistoquímica, pelo método de peroxidase-antiperoxidase (PAP), nos diferentes tecidos que compõe o trato genital da égua e a variação de reatividade destes receptores durante o ciclo estral e no anestro fisiológico. Também se objetivou verificar se há diferença de reatividade em éguas com e sem endometrose. Foram coletadas amostras de útero, cérvix e oviduto, de 41 éguas sem raça definida e com histórico reprodutivo desconhecido, em um abatedouro. Quinze éguas se encontravam em estro, dezoito em diestro e oito éguas em anestro. Concluiu-se que a intensidade e a distribuição da coloração para os receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) e hormônio luteinizante (RLH) variaram de acordo com o tipo de célula e o estágio do ciclo estral. Nas amostras de endométrio observou-se imunorreatividade alta no epitélio luminal para RE e RP tanto no estro quanto no diestro; o epitélio glandular, estroma e miométrio mostraram reatividade moderada para os dois receptores durante as duas fases. Durante o anestro os resultados foram semelhantes aos encontrados durante a fase cíclica. Na avaliação da reatividade para RLH, durante o estro e diestro, o epitélio luminal mostrou reatividade de fraca a moderada, mas no diestro houve maior reatividade média. O epitélio glandular apresentou menor reatividade do que o luminal. No miométrio a coloração foi fraca durante todo o ciclo. Durante o anestro a reatividade foi fraca no epitélio luminal, ausente em quase todas as amostras no epitélio glandular e de fraca a ausente no miométrio. Neste experimento, não foi observada diferença significativa de reatividade entre os endométrios com e sem endometrose, mas as áreas afetadas mostraram coloração assíncrona para RE, RP e RLH. Na cérvix, foi observada imunorreatividade moderada a alta para RE e RP no epitélio luminal, no estroma e no músculo. A intensidade de coloração das células epiteliais e musculares variou pouco entre o estro e o diestro, mas durante o anestro houve maior reatividade no tecido muscular e no estroma. Foi observada reatividade para RLH no epitélio e camada muscular, sem variação significativa nas fases do ciclo. A intensidade de coloração foi de fraca a moderada no epitélio e fraca na camada muscular. No oviduto, observou-se imunorreatividade para RE e RP nos três tecidos, durante a fase cíclica e o anestro. No epitélio, os valores encontrados foram de moderados a altos, sem variação significativa nas três fases. A coloração das células epiteliais do oviduto foi nitidamente irregular, com o núcleo muito corado no que parecem ser células secretoras e pouco corado ou sem coloração nas células ciliadas, refletindo provavelmente as diferentes funções das células epiteliais neste órgão. No estroma a reatividade foi moderada durante a fase luteal, mostrando reatividade mais alta no estro e no anestro. A camada muscular apresentou reatividade máxima para RE no estro e no diestro. A reatividade para RLH no epitélio luminal foi de fraca a moderada durante todo o ciclo. No músculo também foi observada reatividade, porém bem mais fraca do que no epitélio. Durante o anestro somente três das oito amostras apresentaram reatividade

no tecido muscular. No diestro foi observada maior reatividade do que no estro. Os resultados do presente estudo evidenciam, pela primeira vez, a presença de receptores para LH nos diferentes tecidos do trato reprodutor extragonadal da égua. Embora existam relatos da expressão e localização de RE e RP no endométrio equino, esta é a primeira vez que se utiliza a técnica de imunohistoquímica para localizar estes receptores na cérvix e no oviduto desta espécie. Foi observada variação individual bastante acentuada entre as amostras, em uma mesma fase cíclica. Provavelmente estes resultados sejam o reflexo da variação entre o dia do ciclo em que os animais se encontravam, bem como da complexidade dos mecanismos envolvidos na presença desses receptores. Os achados deste estudo indicam que tanto os hormônios gonadais quanto o LH atuam por meio de seus receptores nos diferentes tecidos do trato reprodutivo da égua, podendo servir para a elaboração de novas estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva nesta espécie.

Palavras-chave: receptores para estrógeno, receptores para progesterona, receptores para hormônio luteinizante, oviduto, útero, cérvix, imunohistoquímica

ABSTRACT**IMMUNOHISTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF LUTEINIZING, ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS IN THE EXTRA-GONADAL REPRODUCTIVE TRACT OF MARES***Thesis**Author: Anamaria Telles Esmeraldino**Adviser: Rodrigo Costa Mattos*

The aim of this study was to demonstrate the presence and localization of gonadotropic and steroid hormone receptors, in different tissues of the mare genital tract and the different reactivity to these receptors during the endometrial cycle and physiologic anestrus. Another objective was to compare the reactivity to these receptors in mares with and without endometrosis. Immunohistochemistry was performed using the peroxidase anti-peroxidase technique (PAP). Uterus, cervix and oviduct of 41 criollo mares were collected in an abattoir. There was variation in the intensity of the staining and distribution for estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR) and luteinizing hormone receptors (LHR) with the endometrial cycle and different tissues. The endometrial surface epithelial cells were stained strongly for ER and PR in the estrous and dioestrus; glandular epithelial cells, stromal cells and smooth muscle cells of the myometrium had moderate staining for ER and PR during these two phases and in anestrus too. The immunoreactive score for LHR in the surface epithelial cells during endometrial cycle was weak to moderate but, in general, strong staining was observed in dioestrus. More weak staining intensity was observed in the glandular epithelial cells than luminal epithelial cells. Smooth muscle cells of the myometrium showed weak staining for LHR throughout the endometrial cycle. During the anestrus, the immunoreactivity score was weak in the surface epithelial cells. In general, the glandular epithelium was not stained. Myometrium cells were weak to not staining for LHR, in this phase. In this study there was no significant difference in immunoreactive score for ER, PR and LHR in endometrium with or without endometrosis but fibrotic glands showed different expression patterns of ER, PR and LHR, could evidence for functionally glandular maldifferentiation in endometrosis. The cervical epithelial surface, stromal cells and smooth muscle cells were moderate to strongly staining for ER and PR, with little variation

throughout the endometrial cycle but the immunoreactivity was strongest during the anestrus in muscular and stromal cells. Surface epithelial cells of cervix were weak to moderate stained for LHR; smooth muscle cells showed weak staining for these receptors. There was no variation during cycle. In the oviduct, epithelial, stromal and muscle cells showed reactivity for RE and RP, during cycle and anestrus. Epithelial cells were moderate to strongly staining for these receptors, with evident irregularity in different types of cells. Apparently ciliated epithelial cells were stained but the intensity was much less than that observed in nonciliated epithelial cells, probably reflecting different functions of these cells. Stromal cells showed moderate staining during dioestrus and strongest reactivity in estrous and anestrus; muscle cells showed strong reactivity for ER throughout the cycle. The reactivity for LHR was weak to moderate throughout the cycle in the epithelial cells and weak in the muscle cells. During anestrus only three strains of muscle cells showed reactivity for LHR. In dioestrus the intensity was strongest. These findings evidence for the first time the presence for LHR in extra-gonadal reproductive organs of mare. Though there were reports of ER and PR expression in equine endometrium, this is the first report of localization of these receptors in cervix and oviduct of mare using immunohistochemistry. It was found marked individual variation among the strains. These results probably were caused by the variation among the day of cycle and the complexity of mechanisms involved in the presence of these receptors. The findings of the present study allow us to infer that the ovarian steroid hormones nad LH function through their receptors in different tissues of mare reproductive tract, can help us to elaborate new strategies to improve the reproductive efficiency in this specie.

Keywords: *oestradiol receptors, progesterone receptors, luteinizing hormone receptors, oviduct, uterus, cervix, immunohistochemistry*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Fotomicrografias da expressão de RLH a) cérvix; b) oviduto c) endométrio	54
FIGURA 2 Expressão de RLH no citoplasma de células do epitélio glandular, dentro de foco fibrótico	61
FIGURA 3 Expressão variável de RE e RP no núcleo células do epitélio glandular e Estroma com fibrose.....	69
FIGURA 4 Fotomicrografias da expressão de RE na cérvix: a) estro; b) diestro; c) anestro	70
FIGURA 5 Fotomicrografias da expressão de RP na cérvix: a) estro; b) diestro; c) anestro	70
FIGURA 6 Fotomicrografias da expressão de RE no músculo da cérvix: a) estro; b) diestro; c) anestro	70
FIGURA 7 Fotomicrografias da expressão de RP no músculo da cérvix: a) estro; b) diestro; c) anestro	71
FIGURA 8 Fotomicrografias da expressão de RE no oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro	71
FIGURA 9 Fotomicrografias da expressão de RE no oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro	72
FIGURA 10 Fotomicrografias da expressão de RE no músculo do oviduto: a) estro; b)diestro; c) anestro	72
FIGURA 11 Fotomicrografias da expressão de RP no músculo do oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Escore imunohistoquímico de receptores para LH no trato reprodutivo extragonadal de éguas em anestro, estro e diestro.	54
TABELA 2 Escore imunohistoquímico de receptores para LH no trato reprodutivo extragonadal de éguas em estro, com e sem endometrose	61
TABELA 3 Escore imunohistoquímico de RLH no trato reprodutivo extragonadal de éguas em diestro com e sem endometrose.....	61
TABELA 4 Média e desvio padrão da imunorreatividade no exame imunohistoquímico do útero, dos receptores para estrógeno e progesterona no epitélio luminal, epitélio glandular, estroma e miométrio.....	69
TABELA 5 Média e desvio padrão da imunorreatividade no exame imunohistoquímico da cérvix, dos receptores para estrógeno e progesterona no epitélio luminal, estroma e camada muscular.....	70
TABELA 6 Média e desvio padrão da imunorreatividade no exame imunohistoquímico do oviduto, dos receptores para estrógeno e progesterona no epitélio luminal, estroma e camada muscular.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Hormônios no trato reprodutivo dos mamíferos	15
2.1.1. Hormônios gonadotrópicos	15
2.1.2. Hormônios esteróides	15
2.2. Receptores hormonais	16
2.3. Ciclo estral da égua	18
2.4. Morfofisiologia do oviduto.....	20
2.5. Presença de RE e RP no oviduto	23
2.6. Presença de RLH no oviduto	24
2.7. Morfofisiologia do útero	25
2.8. Variações cíclicas na morfologia e secreção endometrial	26
2.9. Interação do embrião com o trato reprodutivo da égua	27
2.10. Biópsia uterina	28
2.11. Endometrose	31
2.12. Imunohistoquímica	33
2.13. Presença de RP e RE no útero	35

2.14. Presença de RLH no endométrio	42
2.15. Morfofisiologia da cérvix	45
2.16. Presença de RE e RP na cérvix	46
2.17. Presença de RLH na cérvix	48
3. ARTIGOS	50
3.1. Artigo 1. Identificação Imunohistoquímica de Receptores para Hormônio Luteinizante no Trato Reprodutivo Extra-gonadal da Égua	50
3.2. Artigo 2 – Distribuição de receptores para LH no trato genital de éguas com endometrose	56
3.3. Artigo 3 Identificação Imunohistoquímica de Receptores para Estrógeno e Progesterona no Trato Reprodutivo Extra-gonadal da Égua	63
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

A sincronização precisa e funcionalmente relacionada de todas as partes do sistema reprodutor da égua é essencial para a fertilização e desenvolvimento embrionário. O sistema reprodutor está intimamente ligado ao sistema endócrino. O estrógeno e a progesterona coordenam muitos eventos reprodutivos, incluindo complexas modificações físicas e comportamentais associadas com a cópula, a gestação, o parto e a lactação (ING & TORNESI., 1997). Os hormônios esteróides são reguladores do desenvolvimento, diferenciação celular, morfogênese e fisiologia dos órgãos (McDOWELL et al., 1999). Os hormônios gonadotrópicos, LH e FSH, são parte fundamental da fisiologia reprodutiva. A ação biológica destes hormônios inclui o estímulo da maturação testicular e ovariana e a regulação da gametogênese e esteroidogênese. No ovário o LH promove a maturação das células foliculares, levando à ruptura do folículo e liberação do ovócito (Dufau, 1998). Já a formação do antro folicular e a indução de receptores para LH (RLH) dependem da presença de FSH e estradiol (IRVINE & ALEXANDER, 2005).

A ação dos hormônios se dá através de receptores protéicos localizados em diferentes partes da célula. Os próprios hormônios podem regular a produção de seus receptores bem como a síntese de receptores de outros hormônios.

O papel dos hormônios esteróides ovarianos, bem como a expressão de receptores para estes hormônios no endométrio da égua, relacionados com as fases do ciclo estral e com a classificação através de biópsia endometrial têm sido relatado por alguns autores (WATSON et al, 1992; AUPPERLE et al., 2000; AUPPERLE et al., 2003; SCHOON et al., 1999). No entanto não há relatos sobre a localização de receptores para estes hormônios no oviduto e cérvix da égua.

Embora a presença de receptores para LH seja bem estudada nas células da granulosa e da teca nos ovários das diferentes espécies, nas últimas duas décadas, foram descobertos receptores funcionais para LH/hCG distribuídos amplamente nos tecidos não gonadais, incluindo o miométrio, endométrio, oviduto, cérvix e vasos sanguíneos de suínos, bovinos, ratos, camundongos, coelhos e na espécie humana (ZIECIK et al., 2005).

Até o presente momento não são conhecidos relatos sobre a presença de receptores para LH no trato reprodutor da égua. Nesta espécie, o tecido alvo nos estudos histopatológicos e imunohistoquímicos é o endométrio.

Apesar de a biópsia endometrial continuar sendo um procedimento padrão para avaliação da performance reprodutiva da égua, nas últimas décadas, tem sido desenvolvidas novas técnicas na tentativa de melhorar as informações de interesse clínico. As técnicas de citoquímica e imunohistoquímica têm sido utilizadas para identificar diversas estruturas teciduais, facilitando o estudo da morfologia, função e doenças do endométrio da égua (SCHLAFER, 2007).

Malschitzky et al. (2008) identificaram diferença no perfil protéico e na imunoreatividade de receptores para esteóides, no útero de éguas suscetíveis à endometrite induzida pela cópula, sugerindo que estas diferenças possam afetar a resposta inflamatória e a contratilidade uterina nesta espécie.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição de receptores para hormônio luteinizante, progesterona e estrógeno nos diferentes tecidos que compõem o oviduto, útero e cérvix da égua, através da imunohistoquímica. Objetivou-se também comparar a imunoreatividade destes receptores nas diferentes fases do ciclo estral e com diferentes graus de degeneração endometrial.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 Hormônios no trato reprodutivo dos mamíferos

Os principais hormônios reprodutivos nos mamíferos são as gonadotropinas e os esteróides. As gonadotropinas compreendem o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículoestimulante (FSH) e a gonadotropina coriônica (CG). O hormônio liberador de gonadotropinas regula a liberação das gonadotropinas pela pituitária. Os esteróides envolvidos com a reprodução podem ser agrupados em estrógenos, progestágenos e andrógenos. As fontes destes hormônios incluem os ovários, o corpo lúteo, o córtex da adrenal, a placenta e a unidade feto-placentária (GINTHER, 1992).

2.1.1. Hormônios gonadotrópicos:

A reprodução nos mamíferos é dependente da liberação pulsátil dos hormônios gonadotrópicos, que agem juntos para regular a função gonadal. A ação biológica do LH e do FSH compreende o estímulo da maturação e função dos testículos e ovários, levando à regulação da gametogênese e esteroidogênese (DUFAU, 1998).

As gonadotropinas são glicoproteínas constituídas por 24% de carboidratos e o restante de proteínas (GINTHER, 1992). Esses hormônios possuem duas subunidades, uma subunidade α , que contém 89 aminoácidos e é a mesma para mais de um tipo de hormônio e uma subunidade β que contém de 112 a 142 aminoácidos. É a subunidade β que confere a especificidade de cada hormônio intacto, sendo que isoladamente as subunidades não têm quase nenhuma atividade biológica (NISWENDER, 1993).

2.1.2. Hormônios esteróides:

O estrógeno e a progesterona são os hormônios sexuais esteróides responsáveis pela sincronização funcional de todas as partes do sistema reprodutor feminino, processo essencial para a fertilização e desenvolvimento embrionário (ULBRICH et al., 2003). Tanto a progesterona quanto o estrógeno mediam alterações importantes nos tecidos do aparelho reprodutor durante o ciclo estral e início da gestação (GINTHER, 1992). A cópula e a fertilização requerem a presença de estrógeno que provoca a lubrificação e flacidez do trato reprodutor, além de provocar os sinais de cio. Além disso, o estrógeno é responsável pela proliferação e diferenciação das células uterinas, especialmente as células epiteliais (SUKJUMLONG et al., 2003). Já a progesterona ativa a secreção pelas células uterinas, que

deve estar relacionada com a sobrevivência embrionária e manutenção da gestação (HARTT et al., 2005).

Em trabalho realizado por Spencer et al. (1993), os autores demonstraram que a administração de estradiol-17 β em leitoas no período neonatal aumentou o peso e a espessura do endométrio e alterou a síntese de proteínas uterinas. O estroma mostrou hipertrofia e edema.

Os hormônios esteróides são derivados do colesterol e possuem estrutura similar. As glândulas adrenais e ovários produzem estes hormônios através da endocitose de lipoproteínas, que são clivadas nos lisossomos. O colesterol livre é então esterificado e estocado em gotículas ou convertido no esteróide apropriado. Pela lipossolubilidade, esses hormônios podem ultrapassar a membrana celular por difusão, por isso é provável que não haja estoque de hormônio no interior das células, sendo que alterações nas taxas de secreção se refletem em alterações nas taxas de síntese (NISWENDER, 1993).

O controle da secreção hormonal no sistema reprodutor ocorre através de mecanismos fisiológicos conhecidos como “feedback” positivo e negativo. Quando o nível sanguíneo de hormônios esteróides alcança seu limiar, o hormônio liberador de gonadotropinas e o LH são inibidos, garantindo a regulação homeostática das gônadas. Já o LH aumenta a produção de estradiol no folículo pré-ovulatório; o estradiol, por sua vez, estimula a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo e aumenta o número de receptores para GnRH nas células da pituitária anterior. Neste caso de “feedback” positivo, o aumento de estradiol levou a um aumento indireto de LH causando a ovulação (NISWENDER, 1993). Após a ovulação, o aumento da produção de progesterona acaba por inibir o LH (GINTHER et al., 2006).

2.2. Receptores hormonais

Os hormônios são elaborados por uma variedade de tecidos e carregados por um sistema circulatório comum para todas as células do corpo, mas apenas aquelas células contendo proteínas de ligação, de alta afinidade para o hormônio, têm a habilidade de responder ao mesmo. Estas proteínas de ligação são chamadas de receptores. A ação do hormônio depende das suas propriedades físico-químicas, que determinam a sua habilidade de atravessar a membrana plasmática e entrar nas células (HENRICKS, 1987).

Os receptores são moléculas de proteína ou glicoproteína com subunidades estruturais. A localização celular dos receptores depende da natureza química do hormônio que se liga a ele. Os receptores de hormônios proteínicos, como os gonadotrópicos, que não são solúveis

na membrana das células alvo, têm um domínio extracelular que se liga ao hormônio. Além do domínio extracelular, estes receptores têm ainda uma região transmembrana e uma região intracelular. A ligação do hormônio com o receptor específico resulta na modificação da atividade de um sistema de mensageiro secundário responsável pela modificação causada pelo hormônio na célula (NISWENDER, 1993; ZIECIK et al., 2005).

Todos os tecidos que respondem aos hormônios esteróides contêm um receptor de proteína dentro da célula, que se une especificamente ao hormônio ativo (HAFEZ, 1995). Dentro da célula alvo, o hormônio esteróide é encontrado no citoplasma, ligado a uma proteína relativamente grande. Este complexo protéico esteróide migra e a proteína modifica-se em forma e tamanho. O complexo recém formado penetra no núcleo e provoca uma sequência de respostas fisiológicas específicas para aquela célula.

Existem inúmeros fatores que influenciam na quantidade de receptores nas células alvo, incluindo outros hormônios (regulação heteróloga) e em muitos casos o próprio hormônio (regulação homóloga). Por exemplo, o estradiol e o FSH aumentam o número de receptores para LH nas células da granulosa folicular, enquanto o LH causa diminuição dos receptores para este hormônio (NISWENDER, 1993).

A secreção pulsátil endógena ou exógena de LH ou uma única dose baixa de LH/hCG mantém os níveis de receptores para LH (RLH) nas células de Leydig; no entanto, a elevação de hCG, grande aumento nos níveis de LH ou administração de uma única dose farmacológica destes hormônios pode causar uma diminuição dos RLH e dessensibilização para o sinal hormonal (DUFAU, 1998).

A interação hormônio-receptor é o passo inicial para uma série de eventos biológicos envolvidos no mecanismo de ação dos hormônios peptídicos. Os efeitos hormonais são potencialmente regulados pela concentração do hormônio prevalente, concentração de receptores no tecido alvo e afinidade do receptor pelo hormônio. Quando a concentração sérica de LH declina a níveis basais, ocorre um aumento no número de receptores e na afinidade destes receptores durante o desenvolvimento do corpo lúteo (CL) na égua (ROSER & EVANS, 1983).

O receptor de progesterona (RP) é uma proteína intracelular cuja síntese é induzida por ação do estrógeno nas células alvo. O estrógeno penetra na célula por difusão passiva ou facilitada, ligando-se a um receptor de estrógeno (RE) com alta especificidade e avidéz. O complexo receptor-hormônio é ativado e torna-se altamente nucleofílico, interagindo com a cromatina nuclear e causando a produção de um grupo de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) que codificam receptores de progesterona (PRESS et al., 1988).

A existência de um segundo receptor para estrógeno foi identificada em algumas espécies nos últimos anos, fazendo com que o receptor clássico tenha passado a ser denominado receptor para estrógeno α (RE α), enquanto o novo receptor foi identificado como receptor para estrógeno β (RE β) (ULBRICH et al., 2003). Segundo Pelletier et al. (2000), o RE α é o subtipo predominante no trato reprodutivo, com exceção dos ovários, glândula mamária e embrião, onde o RE β media a ação estrogênica. Lecce et al. (2001) compararam a expressão dos dois subtipos no endométrio humano, concluindo que a coloração para RE β é mais fraca do que RE α em todos os tipos celulares. O RE β é um membro da superfamília de receptores esteróides, e níveis baixos, porém detectáveis deste receptor estão presentes no útero e vagina de roedores. O tratamento de camundongos transgênicos sem RE α , não produzem resposta estrogênica característica, a despeito da expressão de RE β . Embora o papel do RE β no trato reprodutor da fêmea ainda não esteja determinado, RE α parece ser o receptor crítico para a mediação da resposta, no útero e vagina, à ação do estrógeno (COOKE et al., 1998).

Provavelmente a marcação de receptores para hormônios esteróides, através da técnica de imunocitoquímica, ocorra tanto em receptores ocupados, como não ocupados pelo hormônio. A localização dos receptores para esses hormônios é majoritariamente intranuclear, o que sugere que eles só estejam presentes no citoplasma durante a síntese protéica do receptor (PRESS et al., 1986).

Os receptores protéicos para LH são similares em todas as espécies já estudadas, consistindo de três domínios distintos: um domínio extracelular responsável pela interação com o hormônio, uma região trans-membrana e uma região intracelular (ZIECIK et al., 2005).

Embora a presença de receptores para LH seja reconhecida há muito tempo nas gônadas, nas últimas décadas estes receptores têm sido identificados em diversos tecidos não gonadais, incluindo o oviduto, miométrio, endométrio e cérvix, em diferentes espécies de mamíferos (ZIECIK et al., 2005).

2.3. Ciclo estral da égua:

O ciclo estral é regulado por um ritmo hipotálamo-hipofisário-ovariano intrínseco que é modulado pelo meio ambiente e por fatores internos neuroendócrinos (PRIEDKALNS, 1993). A luz é um estímulo externo que pode afetar os ovários por meio de mecanismos neuroendócrinos. Os conhecimentos atuais indicam que aumentando a duração de exposição à luz, a retina do olho inicia um estímulo nervoso, que é transmitido via nervo óptico, mas

separado das fibras comuns da visão. Este estímulo nervoso atravessa o gânglio cervical superior e chega à glândula pineal. Esta se localiza profundamente entre os hemisférios cerebrais e atua como um transformador que converte o impulso nervoso que chega, em uma descarga hormonal (NEELY, 1989). Na égua, períodos prolongados de dias curtos estimulam a produção de melatonina, que por sua vez afeta a liberação de GnRH pelo hipotálamo. Ao contrário, no início da estação reprodutiva, há uma inibição da secreção de melatonina devido ao aumento do fotoperíodo diário (PTASZYNSKA, 2001).

Acredita-se que os mecanismos neuroendócrinos que controlam a sazonalidade estão relacionados à modulação das frequências dos pulsos de GnRH e, através destes, da sinalização direta das gonadotrofinas para os ovários. A primavera e o outono são considerados períodos de transição, caracterizados pela frequente irregularidade dos ciclos estrais tanto em relação à duração quanto ao momento em que ocorre a ovulação (PTASZYNSKA, 2001).

O ciclo estral da égua tem duração de 18 a 22 dias, tempo entre uma ovulação e outra e foi dividido por Schoon et al.(1992) nas fases: proliferativa, que dura de 8 a 9 dias e inclui o pró-estro, estro e pós-estro; diestro, que compreende o interestro inicial e intermediário e a fase involutiva, que compreende o interestro final. Pode ser também convenientemente dividido em estro (fase folicular) e diestro (fase lútea). Estro é o período durante o qual a égua está sexualmente receptiva ao garanhão, o trato genital está preparado para aceitar e transportar o espermatozóide e ocorre a ovulação. Durante o estro, o folículo se desenvolve e secreta estrógeno, que induz a receptividade sexual. Durante a ovulação, a liberação do ovócito ocorre aproximadamente 24 a 48 horas antes do término da receptividade sexual. O diestro é o período em que a égua não está receptiva ao garanhão e o trato genital está preparado para aceitar e nutrir o embrião. Após a ovulação, o folículo rompido se transforma em um corpo lúteo, que secreta progesterona. Nesta fase o aparelho reprodutor se prepara para a gestação. O final da fase lútea é marcado pela regressão do CL (luteólise) 14 a 15 dias depois da ovulação e o princípio do estro um ou dois dias depois (DAELS et al., 1993). Sob o ponto de vista da reprodução, as éguas em ambos os hemisférios são tradicionalmente denominadas como poliéstricas estacionais. A duração da exposição às horas de luz é o fator primordial que controla a atividade ovariana estacional. Os períodos de luz diurna prolongados, que ocorrem no verão (15 a 16 horas) estimulam a atividade ovariana, enquanto que os períodos curtos de luz diurna (9 a 10 horas) inibem a mesma. As éguas realizam sua atividade ovariana ciclicamente, em geral no final da primavera, verão e início do outono. Nos

meses de inverno, elas entram em um período anovulatório não cíclico, chamado de anestro invernal (NEELY, 1989).

Fatores secundários relacionados à primavera, como o aumento da temperatura e a melhora da qualidade do alimento, antecipam o início da estação reprodutiva. Há uma forte relação entre o fotoperíodo e a ovulação (PTASZYNSKA, 2001).

Existe uma grande quantidade de variações individuais regulando o comportamento clínico e a atividade ovariana. O estro pode ocorrer mesmo durante a estação não ovulatória, em éguas prenhes e ainda em éguas ovariectomizadas, possivelmente como resultado da síntese de andrógenos pelas glândulas adrenais (GINTHER, 1992). Durante a estação reprodutiva a égua pode apresentar comportamento de anestro, causado por gestação, má condição corporal, anormalidades cromossômicas, corpo lúteo persistente ou ainda tumores ovarianos (ALLEN & SHORT, 1997).

2.4. Morfofisiologia do oviduto:

O oviduto dos mamíferos tem papel fundamental na reprodução. As células epiteliais criam um ambiente único, que permite o transporte e maturação dos gametas, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (AGUILAR & REYLEY, 2005; DESANTIS et al., 2010).

A mucosa-submucosa do oviduto é constituída por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo (BANKS, 1993). A mioosalpinge é constituída por uma musculatura extrínseca originada da mesosalpinge e pela musculatura intrínseca. Na égua estes dois componentes são representados por uma única estrutura muscular que vai da mesosalpinge para a base das pregas internas à mucosa. Neste complexo, a camada muscular extrínseca é formada por um feixe de fibras oblíquas ou longitudinais que gradualmente perdem sua individualidade à medida que alcançam a ampola. A musculatura intrínseca é formada por uma trama de feixes musculares frouxos distribuídos pela ampola e istmo, formando uma camada interna circular e compacta, na junção útero-tubária e no istmo. Apesar de ter sido descrita como longitudinal ou longitudinal e circular, a mioosalpinge foi analisada em três dimensões por Germanà al.(2002), que descreveram uma arquitetura plexiforme das camadas musculares, formando uma estrutura semelhante a esfíncter na junção útero-tubária. Este arranjo muscular plexiforme favorece a mistura dos elementos presentes na luz tubular, como hormônios e nutrientes. Por outro lado há uma intensificação no contato dos gametas, zigotos

e embriões, propiciando uma correta fertilização e desenvolvimento embrionário (MOTTA et al., 1999).

O oviduto pode ser dividido em três segmentos com diferenças anatômicas e funcionais: infundíbulo, ampola e istmo. A mucosa do oviduto é revestida por epitélio cilíndrico simples, com células ciliadas e não ciliadas. A ciliogênese, bem como a movimentação dos cílios em direção ao útero, ocorre em resposta aos níveis de estrógeno circulante. Já as células secretoras, que não possuem cílios, ficam mais altas em resposta à progesterona circulante, tendo a provável função de nutrir o zigoto e capacitar os espermatozóides (BANKS, 1993).

As contrações do istmo obedecem a diferentes direções de acordo com a fase do ciclo estral. Na fase folicular as contrações antiperistálticas tendem a mover o conteúdo luminal para a ampola, enquanto na fase luteal as contrações movem gradualmente o zigoto em direção ao útero (PRIEDKALNS, 1993). A atividade da mioosalpinge é considerada mais importante do que os batimentos ciliares para o transporte dos gametas e do embrião na luz do oviduto (GAWRONSKA et al., 1999).

A mioosalpinge espessada que envolve a mucosa do istmo, com estrutura tridimensional, pode gerar um movimento turbulento do conteúdo luminal, otimizando o microambiente interno e favorecendo as condições para o desenvolvimento embrionário durante sua passagem em direção ao útero (DESANTIS et al., 2010).

O infundíbulo capta o ovócito que sai do ovário através das fímbrias, que se movem por contrações rítmicas do músculo liso. Os cílios das células epiteliais infundibulares movimentam o óvulo em direção à ampola caudal, onde ocorre a fertilização. Na ampola a atividade ciliar move o zigoto em direção ao istmo (PRIEDKALNS, 1993).

O istmo promove a motilidade e mantém a viabilidade do esperma até a capacitação e liberação para progressão na ampola, onde vai ocorrer a fertilização, de uma forma que pode ser hormônio e/ou ciclo específica (MURRAY, 1997; HUNTER et al., 1991). Em estudo realizado por Desantis et al. (2010), os autores observaram que o istmo contém a maior quantidade de células secretoras, sugerindo a produção por estas células, de um meio especial para prevenção da fertilização poliespermática, manutenção da fertilidade do esperma, capacitação e hiperativação da motilidade dos espermatozóides. Os autores sugerem ainda, que a função deste segmento seja importante, especialmente nos equinos, espécie em que a fertilização pode ocorrer até seis dias após a cópula.

Em contraste com outras espécies domésticas, a luz do oviduto na égua parece ser isolada da luz uterina por uma junção útero-tubárica apertada, que previne a ascensão do conteúdo uterino para o oviduto (MIRAGAYA et al., 1997).

A retenção dos espermatozóides em um reservatório no istmo pode ocorrer pela constrição deste segmento, por diminuição na motilidade dos espermatozóides, por ligação destes com as células epiteliais ou com o muco presente na luz, pelo edema da mucosa do oviduto ou por uma combinação destes fatores (THOMAS et al., 1994). Os espermatozóides ligados às células do oviduto apresentam viabilidade aumentada e mantêm o cálcio em níveis basais, podendo prevenir a capacitação prematura.

Em estudo “in vitro” com células epiteliais das regiões da ampola e do istmo, Thomas et al.(1994) evidenciaram que um maior número de espermatozóides se ligaram às células do istmo, embora também tenham se ligado ao epitélio da ampola. Os autores observaram ainda, que as células retiradas do oviduto nos estágios folicular e pós-ovulatório ligaram mais espermatozóides do que as retiradas durante o diestro, sugerindo a existência de especificidade anatômica e cíclica na ligação dos espermatozóides com as células do epitélio do oviduto. Segundo os autores, estas diferenças podem ser causadas por variações na secreção de muco, secreção protéica ou ainda, por efeito de esteróides endógenos. Neste experimento, a adição de estrógeno e progesterona no cultivo celular não alterou a motilidade nem a ligação dos espermatozóides com as células epiteliais, sugerindo que os esteróides por si só, não são capazes de regular estes mecanismos

Diferente dos resultados observados por Thomas et al.(1994), Lefebvre & Sampler (1993), cultivando células epiteliais do oviduto de éguas, nas fases de estro, diestro e anestro, não verificaram diferença aparente na qualidade da cultura, na habilidade das células espermáticas de se ligarem ao cultivo ou no tempo de motilidade apresentada pelos espermatozóides.

A interação do espermatozóide com as células epiteliais do oviduto alteram as proteínas sintetizadas por estas células e também as proteínas da superfície espermática (THOMAS & BALL, 1996).

Espermatozóides que apresentam alterações de motilidade, de viabilidade e de morfologia apresentam uma habilidade reduzida de se ligarem às células epiteliais do oviduto, sugerindo uma seleção dos espermatozóides pelas células epiteliais do oviduto (THOMAS & BALL, 1996).

A secreção produzida na tuba uterina tem sido estudada através de diferentes métodos, na tentativa de entender a fisiologia e reproduzir o ambiente ideal para a fertilização *in vitro*.

Esta técnica tem se mostrado especialmente ineficiente na égua. Em experimento realizado por Mugnier et al. (2009), os autores constataram a expressão dos genes codificadores de osteopontina e peptídeo atrial natriurético A no oviduto de éguas, mas a adição destas proteínas não alterou a eficiência da fertilização *in vitro* nesta espécie.

2.5. Presença de RE e RP no oviduto:

O fluido secretado pelo oviduto provavelmente sofre modificações na sua composição de acordo com o nível de estrógeno, ocorrendo o aumento da secreção de proteínas durante a fase folicular do ciclo estral. Sob influência de estrógenos ocorre a proliferação do epitélio luminal e a diferenciação das células secretoras (ULBRICH et al., 2003).

A presença de RE α no núcleo de células do epitélio luminal, do tecido conjuntivo e do músculo no oviduto de ratas, foi relatada por Pelletier et al. (2000), Wang et al. (2000) e Okada et al. (2003). Os autores compararam a intensidade de reação para RE α nos ovidutos de ratas, em diferentes fases do ciclo estral, observando uma intensa reação no núcleo de células musculares, do tecido conjuntivo e do epitélio luminal, durante todas as fases do ciclo estral. Foi observada uma desigualdade nas diferentes porções do oviduto, sendo que na ampola houve uma queda da imunorreatividade no meio do ciclo, enquanto no istmo e no infundíbulo não foi observada esta relação. As células ciliadas do epitélio luminal não apresentaram reatividade.

Em um estudo realizado por Press et al. (1986), em oviduto de mulheres, os autores constataram a presença de RE no núcleo de células epiteliais, do estroma e do músculo liso das três porções do oviduto. Embora tenha sido observada uma acentuada imunorreatividade em todas as fases do ciclo menstrual, houve uma reação mais intensa nas tubas na fase folicular. Em algumas tubas foi observada uma reação muito fraca, mas na maioria delas, inclusive da fase pós-menopausa, a reação foi intensa. Os autores observaram ainda, que o núcleo das células ciliadas corou-se com muito menos intensidade do que o das células secretoras.

Shah et al. (1999) analisaram, através de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais, a presença de receptores para estrógeno e progesterona na tuba uterina humana, observando um aumento de RE nas células da tuba, no início da fase folicular e no meio do ciclo menstrual. Uma reatividade intensa para receptores de progesterona (RP) foi observada no meio do ciclo e no estágio luteal. Já as tubas de mulheres na menopausa não apresentaram reação significativa a nenhum dos dois receptores.

Em estudo realizado com oviduto bovino, utilizando três diferentes técnicas para a expressão e localização de RE e RP, Ulbrich et al.(2003) demonstraram uma grande variabilidade de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) e expressão protéica de RP e RE durante o ciclo estral. A presença de RE α no núcleo das células luminiais foi observada durante todas as fases do ciclo estral, mas de um modo geral ocorreu maior reatividade na fase próxima ao cio. Foi observada ainda, uma intensa reatividade de RP no núcleo das células epiteliais, principalmente no diestro recente. Neste estudo, a coloração intensa de RP no núcleo de células da camada muscular, apenas no início do diestro, sugere que haja uma mediação da progesterona na motilidade da tuba. É possível também, que receptores de estrógeno e progesterona no núcleo das células do estroma possam ativar a resposta de esteróides no epitélio.

Valle et al. (2007) analisaram o oviduto de 22 vacas durante as diferentes fases do ciclo estral e também durante o ciclo com indução de superovulação. Foi detectado RE e RP no núcleo das células ciliadas e secretoras do epitélio, bem como nas células do estroma e músculo, em diferentes regiões do oviduto e em todas as fases do ciclo. Não foi observada diferença de reação para RE nas células epiteliais durante as diferentes fases do ciclo, nem nos animais com alta concentração de estrógeno e progesterona (P4) circulante. Os autores observaram uma reação menor para RP quando a concentração de P4 estava alta, sugerindo um efeito negativo do hormônio sobre o seu receptor, sendo que em todas as regiões do oviduto os RP foram mais evidentes durante o estro. Nas células do estroma, houve uma reação mais intensa para RE durante o estro. No núcleo das células musculares não houve alteração de coloração para RE durante as diferentes fases do ciclo.

2.6. Presença de RLH no oviduto:

A expressão e localização de receptores para hormônio luteinizante (RLH) têm sido demonstradas no oviduto de várias espécies, como em camundongos (ZHENG et al., 2001) suínos (GAWRONSKA et al., 1999; DEREKA et al., 1995), bovinos (MISHRA et al., 2003), perus (infundíbulo) (YOU et al., 2000) e humanos (LEI et al., 1993), pelos métodos de imunohistoquímica e hibridização “in situ”. Os receptores foram localizados principalmente no citoplasma do epitélio luminal, mas também estão presentes nas células do músculo liso e no endotélio vascular. O epitélio da ampola apresentou maior reação em relação ao istmo (FIELDS & SHEMESH, 2004).

Segundo Gawronska et al. (1999), o estradiol promove a síntese de RLH no epitélio e músculo do oviduto, sugerindo que o LH possa causar o relaxamento do oviduto no período

periovulatório, sendo parcialmente responsável pelo relaxamento do istmo durante a fertilização. A influência direta de estradiol no nível de RLH na tuba de Falópio humana também foi demonstrada por Han et al., (1996). Os autores sugerem que o LH possa participar na liberação de prostaglandina ou óxido nítrico.

Ziecik et al. (2005), sugerem que o surgimento pré-ovulatório do LH, além de ocasionar a ruptura folicular e a luteinização das células da granulosa e da teca, teria um papel importante no controle das contrações do oviduto e da abertura da junção istmo-ampola para o espermatozóide e para a sincronização do óvulo na ampola. A ação relaxante no oviduto poderia também facilitar a passagem dos embriões através do istmo em direção ao útero.

2.7. Morfofisiologia do útero:

O útero é um órgão muscular oco que se continua cranialmente com as tubas uterinas e se abre caudalmente na vagina. Está essencialmente situado na cavidade abdominal, mas estende-se por uma curta distância dentro da cavidade pélvica. Está inserido na região sublombar e nas paredes laterais da cavidade pélvica por duas pregas de peritônio denominadas ligamentos largos (SISSON, 1986). O útero da égua é o único dentre as espécies domésticas em que o comprimento dos cornos e o comprimento do corpo são similares (FLOOD, 1987). Nessa espécie o útero funciona como receptáculo para o sêmen. (BANKS, 1993). A parede uterina é flácida, tornando-se rapidamente contraída ao toque, ficando encurtada e com o diâmetro aumentado (GINTHER, 1992; KAINER, 1993). Internamente o óstio uterino de cada oviduto abre-se em uma pequena papila no endométrio, na ponta do corno. A luz uterina é praticamente fechada por pregas endometriais (KAINER, 1993)

A parede do útero é dividida em perimétrio, miométrio e endométrio. O perimétrio é uma típica túnica serosa; o miométrio ou túnica muscular é formado por uma camada circular interna, mais espessa, e por uma camada longitudinal mais fina e externa, continuando-se no mesométrio. Entre as duas camadas, existe uma camada vascular, constituída por grandes artérias, veias e vasos linfáticos (PRIEDKALNS, 1993; BANKS, 1993; BACHA & BACHA, 2000).

O endométrio ou mucosa uterina é revestido internamente pelo epitélio luminal, que varia de cúbico a cilíndrico alto e de simples a pseudo-estratificado, sendo que menos da metade das células são ciliadas. A altura e a estrutura das células epiteliais sofrem variações relacionadas com a secreção de hormônios ovarianos durante o ciclo (KAINER, 1993; PRIEDKALNS, 1993). O epitélio luminal é a interface entre o útero e o meio externo, e uma

vez que ocorra a prenhez, os microvilos das células trofoblásticas placentárias ligam-se diretamente nele (SCHLAFER, 2007).

Em humanos e no macaco Rhesus, o endométrio tem sido dividido em quatro zonas distintas. A zona I é constituída por epitélio luminal e células do estroma subepitelial. Levemente mais profunda, a zona II contém glândulas perpendiculares à superfície. A zona III contém glândulas ramificadas e a zona IV, mais profunda, é a camada basal adjacente ao miométrio, onde as glândulas terminam. Na mulher, a diferenciação secretora ocorre até a zona IV, sendo a zona V praticamente não responsiva a alterações hormonais, já na macaca, a zona V tem proliferação glandular na fase luteal, sob influência da progesterona (SLAYDEN & BRENNER, 2004).

A lâmina própria contém numerosas glândulas endometriais que se abrem no epitélio luminal e servem para produzir e liberar secreções biológicas complexas, que variam dependendo do estágio do ciclo e da gestação. Na égua, a lâmina própria foi dividida por Kenney (1978), em estrato compacto, mais superficial, e estrato esponjoso. O estrato compacto tem espessura de 1mm., é altamente vascularizado, apresentando alta densidade de células do estroma. Esta região é um importante sítio de acúmulo de células inflamatórias. No estrato esponjoso, o estroma que sustenta as glândulas e vasos na camada média e profunda do endométrio está frequentemente associado a alterações fibróticas que podem prejudicar a função glandular e a fertilidade (GINTHER, 1992; BACHA & BACHA, 2000; SCHLAFER, 2007).

Os vasos sanguíneos e linfáticos levam o sangue para o endométrio e drenam a linfa. Existe uma extensa rede de capilares logo abaixo do epitélio luminal. As alterações na parede das artérias uterinas são comuns em éguas de idade avançada e precisam ser diferenciadas de outros agentes. A incidência, bem como a severidade de lesões vasculares, aumenta com o número de gestações e com a idade da égua e está relacionado com a proliferação vascular durante a gestação e subsequente involução (GRÜNINGER et al., 1998).

2.8. Variações cíclicas na morfologia e secreção endometrial:

A estrutura normal do endométrio da égua sofre alterações cíclicas e estacionais que incluem mudanças na altura do epitélio luminal, na configuração das glândulas e na quantidade de edema na lâmina própria. Essas mudanças estão relacionadas com o domínio de estrógeno e progesterona que variam durante o ciclo estral (DOIG & WAELCHLI, 1993).

Durante o anestro, quando o endométrio da égua não está sob influência dos hormônios ovarianos, o epitélio luminal varia de cúbico a escamoso (DOIG &

WAECHLI,1993). Já o epitélio glandular pode variar ainda de escamoso a colunar (KENNEY, 1978). As glândulas encontram-se atrofiadas, com a luz contraída, de forma afilada e em baixa densidade em comparação com os demais estágios, podendo ainda a atrofia não ser uniforme (DOIG & WAECHLI,1993; KENNEY, 1978).

Quando o endométrio da égua está sob o domínio do estrógeno, o epitélio luminal mostra-se colunar alto ou pseudoestratificado, enquanto o epitélio glandular é colunar alto. As glândulas são retas e não tortuosas, com uma baixa densidade, provavelmente como resultado do edema da lâmina própria. Nos capilares é comum a presença de polimorfonucleares (DOIG & WAECHLI,1993; KENNEY, 1978; GINTHER, 1992; PINEDA, 1989).

Já durante o diestro, sob o domínio da progesterona, o epitélio luminal varia bastante. As glândulas frequentemente mostram-se tortuosas e em maior densidade, provavelmente pela ausência de edema (DOIG & WAECHLI,1993; KENNEY, 1978; GINTHER, 1992).

O perfil protéico da secreção endometrial da égua varia de acordo com a fase do ciclo estral, sugerindo que essas diferenças estejam relacionadas tanto ao processo de manutenção e desenvolvimento embrionário como a uma necessidade de eventual resposta inflamatória (MALSCHITZKY et al., 2008).

2.9. Interação do embrião com o trato reprodutivo da égua

O embrião equino só chega ao útero após atingir um estágio de maturidade que permita a secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂), o que ocorre a partir do quinto dia após a ovulação. Esse tempo pode ser necessário para que o útero esteja hormonalmente preparado para nutrir o embrião (ALLEN, 2001). A placentação na égua só inicia por volta dos 40 dias de gestação, sendo a mais tardia dentre as espécies domésticas (STEWART et al., 2000). Antes da formação da placenta o embrião tem contato com a secreção uterina, que o supre com oxigênio e substratos metabólicos (ALLEN, 2001). Entre os dias sete e 17 de gestação, o embrião apresenta uma fase de grande mobilidade, que é necessária para o reconhecimento materno da gestação (GINTHER, 1995). Até o dia 22 da gestação, o embrião é recoberto por uma cápsula que lhe garante uma forma esférica, permitindo sua mobilidade e o acúmulo na sua superfície, de proteínas e outros componentes da secreção endometrial. Esta é, provavelmente, a única forma de nutrição do embrião durante este estágio. A partir do dia 21, essa cápsula começa a se desintegrar, permitindo maior contato do embrião com as glândulas endometriais, mas somente a partir dos 36 dias de gestação é que as células do anel coriônico

começam a invadir o epitélio glandular, dando início à formação dos cálices endometriais (ALLEN, 2001).

2.10. Biópsia uterina:

A biópsia endometrial tem sido utilizada para o diagnóstico da doença uterina e para o prognóstico da probabilidade de gestação na égua. Esta técnica faz parte da avaliação em éguas com problemas reprodutivos. O procedimento envolve a colheita, processamento, exame microscópico e interpretação do tecido endometrial obtido transcervicalmente, com instrumento especial para este procedimento. A análise histológica do endométrio precisa ser interpretada por um patologista experiente (WAELECHLI, 1990).

A classificação endometrial elaborada por Kenney (1978) descrevendo as variações normais do endométrio de acordo com o ciclo estral através de biópsia e a classificação do endométrio de acordo com alterações como fibrose e infiltração de células inflamatórias Kenney e Doig (1986), é amplamente utilizada como prognóstico da fertilidade na égua por sua praticidade e alto índice de correlação entre as características morfológicas do endométrio, e a capacidade da égua de levar a gestação a termo. Essa classificação é feita com base nas estruturas morfológicas normais do endométrio e no grau e amplitude de alterações que possam ser encontrados no tecido, como fibrose, inflamação e lacunas linfáticas. Kenney (1978) propôs originalmente um sistema baseado em três categorias, sendo a categoria I formada por um endométrio morfolologicamente sadio, a categoria II por alterações leves no endométrio e a categoria III representada por alterações endometriais severas. Em 1986, Kenney & Doig propuseram um sistema de categorização em quatro estágios, dividindo a categoria II em IIA e IIB, sem alteração das duas outras categorias. Este sistema passou a ser utilizado amplamente e pode ser resumido em: categoria I, quando o endométrio apresenta morfologia normal ou com alterações leves como fibrose esparsa ou inflamação discreta. A categoria IIA representa o endométrio com reação inflamatória leve à moderada, difusa no estrato compacto ou inflamação multifocal no estrato compacto e esponjoso, com poucas células. Quanto à fibrose, estariam incluídos nesta categoria, endométrios apresentando fibrose constante e dispersa, envolvendo ramos glandulares e apresentando de uma a três camadas de fibras ou formando ninhos fibróticos ao redor de ramos glandulares, sem exceder dois ninhos por 5mm. de campo linear em até quatro campos. A presença de ramos glandulares dispersos, com distensão cística, associada com atrofia glandular ou lacunas linfáticas, que produzam alterações localizadas e palpáveis nas pregas endometriais também

qualificaria o endométrio na categoria IIA. A associação de inflamação e fibrose rebaixaria o endométrio para a categoria IIB. Nesta categoria também está incluído o endométrio com inflamação difusa e moderada no estrato compacto ou inflamação focal moderadamente severa, ou ainda o endométrio com fibrose esparsa e moderada, com quatro ou mais camadas ao redor de ramos individuais ou a formação de dois a quatro ninhos por 5mm. de campo linear. A presença de degeneração glandular cística constante, mas irregular, associada com atrofia glandular também qualifica o endométrio para a categoria GIIB. O somatório das alterações fibróticas e inflamatórias desta categoria rebaixam o endométrio para a categoria GIII. Na categoria GIII inclui-se o endométrio com inflamação difusa e severa no estrato compacto ou fibrose constante e uniforme de ramos glandulares individuais. A presença de cinco ou mais ninhos fibróticos por 5mm. de campo linear também qualifica o endométrio em GIII, bem como degeneração glandular cística severa associada com atrofia durante a estação reprodutiva ou ainda, lacunas linfáticas tão severas que produzam uma alteração palpável semelhante a gel nas pregas endometriais.

Segundo Doig & Waelchli (1993), o maior benefício da categorização endometrial através da biópsia é identificar aquelas éguas que muito dificilmente teriam condições de levar uma gestação a termo, pois estes animais representariam uma perda econômica contínua para seus proprietários. No entanto os autores observaram que dentro de uma mesma categoria, as éguas mais jovens apresentam maior fertilidade, sugerindo que a diminuição da fertilidade deve-se em parte à severidade da fibrose endometrial que aumenta com a idade da égua. Os autores relatam ainda, que o número de temporadas em que a égua permanece vazia tem influência direta na taxa de prenhez de animais em uma mesma categoria, sendo que na categoria GIIB esta diferença é ainda mais evidente. Nas categorias I e III há uma grande correlação entre a classificação e a taxa de parição.

Segundo Schoon & Schoon (2003), a categorização proposta por Kenney & Doig (1986), foi amplamente aceita pela facilidade de quantificação das alterações endometriais em um código numérico que permite a comparação estatística. No entanto os autores consideraram que outras avaliações complementares deveriam ser levadas em conta, como o histórico reprodutivo do animal (SCHOON et al., 1997) e a diferenciação das glândulas endometriais (SCHOON et al., 1999, 2000). Um fator importante que é negligenciado na categorização é a relação entre os achados histológicos, físicos e ambientais, pois a sincronia entre a morfologia endometrial e o estágio do ciclo é fundamental para a fertilidade da égua. A biópsia endometrial é uma das importantes ferramentas para compor o diagnóstico e prognóstico de animais clinicamente inférteis ou subférteis, inclusive por possibilitar, através

da imunohistoquímica, a análise funcional do endométrio através da morfologia e presença de receptores hormonais. No entanto a diferenciação glandular, angiopatias degenerativas e vasculites observadas no endométrio não podem ser negligenciadas, bem como a idade da égua e aspectos individuais (SCHOON & SCHOON, 2003),

Outro problema na interpretação da biópsia endometrial é a variação morfológica que ocorre nas diferentes fases do ciclo estral e anestro. Ninhos fibróticos podem estar mais próximos durante o anestro, quando as glândulas estão atrofiadas e o estroma mais denso. Com o edema e a hiperplasia glandular na estação reprodutiva, estes ninhos se afastam e a classificação pode se alterar. Já os ninhos não fibróticos são comuns no anestro e no período de transição e podem ser confundidos com ninhos fibróticos pela contração do estroma ao redor do ninho. O conhecimento das alterações morfológicas na densidade do estroma e na conformação glandular durante as diferentes fases do ciclo pode prevenir problemas de interpretação. Pode haver também variação entre as diferentes áreas do endométrio, fazendo com que a avaliação de uma única biópsia seja mal interpretada (GROSS et al.,1984).

Em um experimento realizado por Schoon et al. (2000), o endométrio de oito éguas com diferenciação desigual, com atividade predominantemente proliferativa, apresentou receptores para estrógeno e progesterona com reatividade normal nas glândulas em sincronia com o ciclo, sendo que nas glândulas e estroma com má diferenciação houve uma quantidade exacerbada de receptores. Nas biópsias endometriais que apresentaram diferenciação irregular, representada por polimorfismo do epitélio glandular, a expressão de receptores para estrógeno foi alta, enquanto a expressão de receptores para progesterona foi baixa. O padrão de distribuição dos receptores foi uniforme, mas em uma mesma glândula foi observada grande variabilidade, tanto no número de núcleos positivos quanto na intensidade da coloração. No endométrio com diferenciação secretora irregular, representada por glândulas grandes e muito ativas, o autor observou imunorreatividade para RE e RP de moderada a alta, sendo que o número de núcleos positivos e a intensidade variaram de uma glândula para outra. No endométrio com diferenciação completamente irregular foi observada uma grande variedade tanto no número quanto na intensidade de reação dos receptores.

Segundo Hendrickson et al. (2007) e Haney (2004), a biópsia endometrial não tem mais um papel importante na avaliação da infertilidade na mulher por três razões: o “status” endócrino da paciente é feito através de testes sofisticados que medem os níveis de gonadotropinas e esteróides na circulação; as doenças uterinas orgânicas hoje são detectadas por imagem e, finalmente, nos últimos anos estudos muito cuidadosos têm concluído que a biópsia endometrial é um bioensaio de pouca credibilidade para avaliar a fertilidade. Isso se

deve basicamente à heterogeneidade morfológica substancial do endométrio funcional. No entanto a utilização da biópsia endometrial é defendida em artigo publicado por Garcia (2004), como forma de diagnosticar o endométrio “fora de fase” em mulheres inférteis por um defeito na fase luteal, que, segundo Hendrickson et al. (2007), resulta em um baixo nível de progesterona na circulação, levando a um endométrio secretor subdesenvolvido.

Coutifaris (2004) deixa claro em seu artigo, que embora não acredite em datar histologicamente o endométrio da mulher para diagnosticar infertilidade, a utilização da biópsia endometrial pode ser válida, inclusive para identificação de marcadores moleculares do desenvolvimento e função endometrial, desde que a importância destas substâncias seja comprovada clinicamente.

A biópsia endometrial continua sendo de grande importância para o prognóstico de fertilidade na égua, devido à correlação que há entre as lesões microscópicas do endométrio e a habilidade da égua de levar a gestação a termo. Esta técnica é limitada pela má qualidade do material colhido, pela falta de informação do histórico clínico pertinente e pela falta de experiência dos técnicos envolvidos com o diagnóstico. O valor diagnóstico de uma única amostra de endométrio também tem sido discutido por vários autores (KELLER et al., 2004; RICKETTS & ALONSO, 1991a; BALL, 1993).

Embora a biópsia continue sendo o método primário de acesso endometrial, novas técnicas têm sido desenvolvidas e estão sendo utilizadas para aumentar e ampliar as informações sobre a saúde do endométrio da égua (SCHLAFER, 2007). Uma estimativa mais precisa da morfologia funcional do endométrio nessa espécie pode ser adquirida através de técnicas como a imunohistoquímica e a morfometria (AUPPERLE et al., 1997; ÖZGEN et al., 1997).

2.11. Endometrose

A endometrose é um processo progressivo e irreversível e é uma causa importante de infertilidade na égua (HOFFMANN et al., 2003). O termo endometrose foi sugerido por Kenney (1992), para caracterizar a presença de fibrose endometrial, além de outras patologias como acúmulo de linfa. Schoon et al. (1995) sugeriu que o termo endometrose fosse utilizado para caracterizar apenas a fibrose endometrial, ativa ou inativa, no estroma e/ou periglandular, incluindo as alterações glandulares dentro da área de fibrose. Embora a análise da fibrose endometrial seja feita de forma qualitativa, a partir da biópsia.

Embora a avaliação da fibrose periglandular endometrial através da biópsia seja semiquantitativa e subjetiva, feita somente com base no exame histológico, Schlafer (2007)

afirma que esta alteração pode ser analisada quantitativamente através de colorações específicas para fibra colágena, combinada com a análise de imagem pelo computador.

A endometrose se manifesta inicialmente por uma diferenciação morfológica e funcional atípica, das células do estroma periglandular, caracterizada por grandes células poligonais, produtoras de fibras colágenas. Na fibrose mais avançada predominam os miofibroblastos e fibroblastos, sem síntese de colágeno. Nas glândulas fibróticas, a diferenciação das células epiteliais, que normalmente depende do nível de esteróides, pode estar sincronizada com o ciclo ou não (HOFFMANN et al., 2008).

Segundo Ricketts & Alonso (1991b), a endometrose é um processo progressivo e irreversível que está correlacionado com a idade da égua. O endométrio com fibrose parece perder sua capacidade de prover o conceito em desenvolvimento com sua secreção, considerada essencial na espécie equina, já que o período pré-implantação é longo e o trofoblasto não é invasivo. É bastante provável que éguas com endometrose sejam mais predispostas a sofrer perda embrionária causada pela alteração da secreção uterina (HOFFMANN et al. 2009). A endometrose periglandular pode causar danos à superfície endometrial, retardar o desenvolvimento microcotiledonário, reduzir a taxa de crescimento fetal e alterar a secreção endometrial (EVANS et al., 1998).

Walter et al. (2001) compararam, através de imunohistoquímica, as proteínas presentes na matriz extracelular do endométrio de éguas com e sem endometrose, demonstrando a presença de colágeno IV, fibronectina e laminina, além de miofibroblastos nas áreas de fibrose periglandular. Em outro estudo, Walter et al.(2005) sugerem que um distúrbio na expressão de enzimas com a função de degradar a matriz extra-celular, como as metaloproteinases ou ainda em relação a um antagonista da degradação da matriz, como a transglutaminase poderiam causar um desequilíbrio entre a produção e a degradação de matriz extracelular, explicando assim, a fibrose periglandular no endométrio da égua.

Em estudo comparando a atividade de metaloproteinases-9 e -2 no fluido uterino antes e após endometrite induzida, Oddsdóttir et al. (2008), sugeriram que a fibrose endometrial seja causada pela remodelagem pós-inflamatória envolvendo estas enzimas e seus inibidores.

Em um experimento no endométrio de 48 éguas com diferentes graus e tipos de endometrose, Hoffmann et al. (2009) identificaram o padrão de expressão de proteínas endometriais e a presença de glicogênio e mucopolissacarídeos nas células epiteliais glandulares. Só foram observadas alterações significativas nos casos de endometrose destrutiva. Em todos os casos houve uma variação de coloração, com tendência a diminuição da reatividade. Os autores assinalaram que mesmo pequenas alterações na secreção uterina

podem interferir na interação entre o útero e o embrião. Em outro estudo feito por Ellenberger et al. (2008) foi investigada, através da imunohistoquímica, a distribuição de três proteínas secretadas pelo útero e dependentes de progesterona, na placenta e útero de éguas durante a gestação. A uteroferrina mostrou aumento da intensidade na fase mais adiantada da gestação, embora tenha sido detectada durante todos os estágios. A uterocalina, proteína mais dependente da progesterona, mostrou coloração variável no decorrer da gestação, com maior intensidade no início. Já da uteroglobina, foram detectados apenas traços em algumas glândulas durante toda a gestação. Hoffmann et al. (2009) demonstraram que no endométrio de éguas com endometrose, a secreção de uterocalina no epitélio de glândulas distendidas no interior de ninhos fibróticos é anormal e sem sincronia. Ellenberger et al. (2004) caracterizaram, através de imunohistoquímica, a má diferenciação endometrial quanto à secreção de proteínas, observando um padrão atípico de secreção pelas células epiteliais, independente da causa de má diferenciação.

Lehmann et al. (2011), compararam, através da imunohistoquímica, a expressão de RE e RP e as características de expressão de proteínas no endométrio de éguas com variados graus de endometrose. As éguas foram divididas em vazias e gestantes. Foi observado que nas glândulas afetadas houve diminuição da secreção de uteroglobina. Nas éguas gestantes foi observada endometrose leve e não destrutiva. As éguas de ambos os grupos apresentaram assincronia nas células do estroma quanto aos RE e RP, nas áreas de fibrose periglandular, indicando que estas áreas podem apresentar um mecanismo de controle distinto das outras regiões do endométrio.

2.12. Imunohistoquímica:

O princípio da técnica de imunohistoquímica é a detecção de uma proteína ou antígeno presente nas células, pelo uso de anticorpos. O aumento da sensibilidade dos anticorpos e os métodos de recuperação de antígenos em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina têm estabelecido uma maior aplicabilidade desta técnica na prática clínica (BRASILEIRO FILHO et al., 2006; MYLONAS et al., 2009). O produto da reação imunohistoquímica deve ser sempre interpretado em conjunto com os achados morfológicos e não simplesmente em termos de reação positiva ou negativa (BRASILEIRO FILHO et al., 2006).

Os anticorpos empregados em uma reação imunohistoquímica podem ser mono ou policlonais. Os anticorpos policlonais são produzidos em múltiplas espécies animais, como coelho, cavalo, cabra e galinha, apresentando maior afinidade e ampla reatividade, mas baixa

especificidade quando comparados aos anticorpos monoclonais. Já os anticorpos monoclonais são produzidos principalmente em camundongos, que são injetados com antígeno purificado e após desenvolverem resposta imune, os linfócitos B são coletados do baço ((BRASILEIRO FILHO et al., 2006; RAMOS, 2005).

O complexo antígeno-anticorpo só pode ser observado ao microscópio óptico após ser ligado a um cromógeno específico. As duas formas de marcação mais utilizadas são a imunofluorescência ou a técnica imunoenzimática (BRASILEIRO FILHO et al., 2006). Os sistemas de detecção são classificados em métodos diretos ou indiretos (RAMOS, 2005). No método de imunofluorescência direta o anticorpo primário é ligado a um composto fluorescente. Na reação indireta, após a ligação do antígeno com o anticorpo primário, a substância fluorescente é ligada a um anticorpo secundário que reage com o anticorpo primário. A técnica indireta é mais específica, já que só é visível após duas reações antígeno-anticorpo, o que permite maior controle da reação (BRASILEIRO FILHO et al., 2006). Pelo método imunoenzimático, no lugar de uma substância fluorescente, uma enzima é acoplada ao anticorpo. A enzima mais frequentemente utilizada é a peroxidase, razão pela qual se fala comumente em técnica de imunoperoxidase. A enzima atua sobre o peróxido de hidrogênio promovendo a transferência de elétrons a partir de uma substância cromógena, que se precipita como um pigmento insolúvel e polimerizado. O tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzadina (DAB) é um dos substratos mais utilizados e confere coloração marrom escura no local da reação. Para aumentar a sensibilidade deste método, foram desenvolvidas técnicas adicionais, como, por exemplo, a de peroxidase-antiperoxidase (PAP), que consiste em uma reação em cadeia de três anticorpos, sendo o anticorpo terciário um complexo formado por dois anticorpos e três moléculas de peroxidase. Este excesso de peroxidase em relação ao número de anticorpos primários permite a identificação de um grande número de sítios antigênicos nos tecidos, mesmo naqueles fixados de modo rotineiro (BRASILEIRO FILHO et al., 2006).

A produção de anticorpos monoclonais contra receptores hormonais e a caracterização de técnicas imunohistoquímicas usando estes anticorpos têm permitido a localização de receptores nos diferentes tecidos do trato reprodutivo da fêmea (PRESS et al., 1986). Embora técnicas de detecção de receptores através de ligantes nos esteróides possam determinar a quantidade de receptores presentes nos tecidos, elas não indicam a distribuição destes receptores nos diferentes tipos celulares, porque essas análises requerem a homogeneização do tecido para obter um extrato livre de células (PRESS et al., 1988). Ao desenvolverem um anticorpo monoclonal para detecção de RE em tecidos de rato, Yamashita & Korach (1989)

concluíram que os receptores, tanto ocupados quanto desocupados, se encontram no núcleo das células em diferentes tecidos, incluindo útero e vagina.

2.13. Presença de RP e RE no útero:

Estudos realizados no endométrio humano demonstraram que a concentração de RE no estroma e nas glândulas é máxima na fase proliferativa do ciclo menstrual e declina na fase secretora. A presença de RE nas células epiteliais do endométrio no início da fase secretora parece representar uma transição entre o máximo da imunorreatividade das células epiteliais, característica da fase proliferativa e a fraca reatividade da fase secretora (PRESS et al., 1984). Em outro estudo realizado por Press et al. (1986), não foi observada diferença de reatividade para RE nas diferentes regiões do endométrio pesquisada. Todas as regiões mostraram coloração intensa nos núcleos das células do epitélio glandular e luminal, bem como no núcleo das células do estroma, na fase proliferativa. Durante esta fase e no início da fase secretora, não foi observada diferença de intensidade na coloração do epitélio glandular basal e funcional. Entretanto na fase secretora tardia houve uma coloração fraca na porção funcional e forte na porção basal. Nesta fase, o epitélio luminal mostrou grande variabilidade individual. Os núcleos das células musculares do miométrio coraram intensamente durante todo o ciclo menstrual. A concentração de RP no epitélio glandular é também alta na fase proliferativa sob influência do estrogênio, diminuindo após a ovulação, quando há aumento de progesterona. Já a presença de RP no estroma endometrial e no miométrio não tem variação significativa ao longo do ciclo menstrual (SNIJDERS et al., 1992; MYLONAS et al., 2004). Coopens et al. (1993), encontraram diferença significativa de imunorreatividade nas diferentes regiões do endométrio e da tuba uterina, sendo a região do fundo da cavidade uterina e a ampola da tuba uterina da mulher, as zonas com maior reatividade para RP e RE.

Em trabalho realizado por Press et al. (1988), usando anticorpo monoclonal para RP, foi observado que as células endometriais apresentavam diferentes proporções de imunorreatividade e variação na intensidade de coloração durante o ciclo menstrual. No início da fase secretora, 4 a 5 dias após a ovulação, houve uma redução tanto na proporção de células epiteliais coradas quanto na intensidade de coloração, no entanto as células do estroma não sofreram redução de imunorreatividade. Do meio até o final da fase secretora, tanto as células epiteliais glandulares quanto as células do epitélio luminal mostraram pouca ou nenhuma coloração. Algumas glândulas da zona basal mostraram uma forte reatividade principalmente no final da fase secretora. O núcleo das células musculares, no miométrio, apresentou uma forte reatividade tanto na fase secretora quanto na fase proliferativa do ciclo.

Em um estudo realizado em primatas, Slayden & Brenner (2004) reproduziram o ciclo menstrual através da administração de estrógeno e progesterona em macacas ovariectomizadas. Eles notaram que o tratamento apenas com estrógeno provocou uma fase proliferativa artificial, caracterizada pela proliferação de células epiteliais endometriais e pelo aumento de RE e de RP nestas células e também no estroma. Segundo os autores, a progesterona age no endométrio sob efeito do estrógeno, para induzir a diferenciação secretora e suprimir os RE no epitélio e no estroma da zona funcional do endométrio, no entanto os receptores permanecem nas células epiteliais da zona basal durante a fase secretora.

Sukjumlong et al. (2003), realizaram experimento no útero de porcas em idade reprodutiva, constatando a presença de RE α no núcleo das diferentes células que compõe o endométrio e miométrio, com variações durante todo o ciclo estral. A imunorreatividade do núcleo das células epiteliais foi maior no início do diestro; já no miométrio, a coloração foi mais intensa no pró-estro e estro, quando o nível de estrógeno na circulação é maior, sugerindo que nestas fases o miométrio seja um tecido alvo importante para o estrógeno. No estroma a reatividade foi maior durante o estro. Estes achados sugerem, segundo os autores, uma reação diferente entre os tipos celulares, com uma mesma concentração de estrógeno circulante. Essas variações de imunorreatividade também foram observadas no útero bovino por Boos et al (1996).

A influência do estágio do ciclo estral na atividade miometrial na égua parece ser diferente do que o observado em outras espécies de grandes animais. Durante o estro, o miométrio da égua apresenta extensos períodos de completa inatividade elétrica, separados por fases bem definidas de atividade, com picos muito próximos e de alta amplitude. No diestro ocorrem fases mais difusas de atividade elétrica, com picos de baixa amplitude, separadas por períodos variáveis de relativa inatividade. Em contraste, no miométrio da ovelha e da vaca, durante o estro, ocorrem fases de atividade elétrica muito intensa e frequente; já no diestro há uma quase total ausência de atividade (TAVERNE et al., 1979).

Um estudo eletromiográfico no útero suíno mostrou que as características da motilidade uterina são fortemente afetadas pelos estágios do ciclo estral, sendo demonstrada uma máxima atividade no estro. Durante o diestro, o corno uterino da porca tem atividade elétrica de baixa amplitude e alta frequência de picos. Embora tenha sido demonstrado em outras espécies que a motilidade uterina é inibida pela progesterona, na égua e na porca ela se continua durante o diestro até que haja influência da gestação. Provavelmente a atividade do miométrio nesta fase esteja relacionada com a migração e reconhecimento da vesícula

embrionária (SCHEERBOOM et al., 1987). Leith & Ginther (1985) observaram que após administração de clenbuterol, um bloqueador das contrações musculares, houve uma menor movimentação da vesícula embrionária no interior do útero, indicando o envolvimento das contrações uterinas na mobilidade da vesícula embrionária.

Segundo Robinson et al. (2001), o estudo da presença de receptores em biópsias uterinas de vacas, mostrou um padrão específico de expressão nos diferentes tipos celulares e nas diferentes fases do ciclo estral. Os RE aumentaram em todas as regiões durante o estro, mas também foram encontradas altas concentrações no epitélio luminal, no meio da fase luteal e na porção mais profunda das glândulas, durante todo o ciclo. A expressão de RP foi maior no estroma do que nas células epiteliais, havendo um aumento durante o estro e início da fase luteal. Meikle et al. (2001), analisaram os níveis de mRNA de RE e RP no endométrio de sete vacas durante as fases de um mesmo ciclo estral. Os autores observaram um maior nível de mRNA para os dois receptores durante o estro, com declínio a partir do quinto dia pós-estro até o final da fase luteal, refletindo a ação estimulatória do estrógeno e a ação inibitória da progesterona sobre os receptores.

Através de cultivo celular utilizando epitélio e estroma do útero bovino, com adição de estradiol e/ou progesterona, Xiao & Goff (1999) concluíram que o número de RP é mais alto no estroma que nas células epiteliais, enquanto o número de RE mostrou-se maior nas células epiteliais. Também foi observado que o estradiol retroalimenta seus próprios receptores, enquanto a progesterona inibe a ativação do estradiol sobre os RP no estroma e epitélio, e sobre os RE no estroma.

Em ovelhas, Wathes & Hamon (1993) observaram que a concentração de RE foi máxima em todas as regiões do útero durante o estro, decrescendo no início da fase luteal, com exceção do epitélio glandular mais profundo, que manteve a imunorreatividade por mais tempo. Os RP foram mais evidentes no início da fase luteal, mas nas glândulas mais profundas eles demoraram mais a se manifestar. O Míométrio se manteve reativo para RP durante toda a fase luteal, enquanto o estroma teve reatividade variável. Segundo os autores, a população de receptores muda de maneira dinâmica durante o ciclo estral e de acordo com os diferentes tipos de célula. A complexidade na formação e perda desses receptores sugere que eles sejam regulados não só pela concentração de esteróides circulantes, mas também por fatores parácrinos locais. Em trabalho realizado por Ing & Tornesi (1997), ovelhas que apresentavam ciclo estral normal foram ovariectomizadas e receberam estradiol, óleo de milho ou progesterona e estradiol. O efeito do estradiol no aparecimento de RNAm e na expressão protéica de RE e RP foi variável dependendo do tempo de administração, do tipo

celular e também da administração prévia de progesterona, sendo que o epitélio luminal foi o menos responsivo à administração pura de estradiol. Já as glândulas mais basais e o miométrio associado a elas mostraram maior expressão de RP e RE. As células do estroma foram as que apresentaram uma resposta mais intensa e prolongada ao tratamento, sugerindo que essas células, que contêm a maioria dos receptores esteróides, possam ter a função de transdução dos sinais do estradiol para as células epiteliais através da ativação de fatores de crescimento. Os autores observaram também, que os animais do grupo controle (tratados com óleo) apresentaram níveis de baixo a moderado, de RE e RP, semelhante ao padrão encontrado em ovelhas em anestro, sugerindo que o útero destes animais tenha receptores mesmo com a privação hormonal. Cherny et al. (1991) também observaram que a ovariectomia em ovelhas não causou um desaparecimento total de RE no útero e que a administração de estradiol e ou progesterona tiveram efeitos variáveis dependendo do tipo celular.

Em um estudo com lhamas, Bianchi et al. (2007), analisaram o corno uterino esquerdo de seis animais através de imunohistoquímica, para a presença de RE e RP, observando que houve mais área positivas e com maior intensidade no estro, nos três tipos celulares. Houve também mais imunorreatividade nas células epiteliais do que nas células do estroma. Os autores concluíram que, assim como em outros ruminantes, também na lhama o estradiol tem um efeito estimulatório, enquanto a progesterona produz efeito inibitório nos RE e RP. Além disso, há uma expressão específica para os diferentes tipos de células do endométrio. Homeida et al. (2010) obtiveram resultado semelhante analisando o útero de camelos.

Wang et. al. (2000) estudando o útero de ratas durante todo o ciclo estral, pelos métodos de hibridização e imunohistoquímica, observaram que o nível de RNAm foi duas vezes maior durante o pró-estro do que no metaestro. No entanto não houve diferença significativa nos diferentes tipos celulares durante todo o ciclo estral. No epitélio luminal a imunorreatividade foi maior no pró-estro e estro do que no metaestro. No estroma, foi observada uma reatividade nuclear de aproximadamente 55% em todo o ciclo. Em outro experimento com ratas ovariectomizadas que receberam estradiol e/ou progesterona, Wang et al.(1999) observaram que de modo geral, o estrógeno aumenta a síntese de RNAm de RE no útero da rata e que a progesterona tem efeito contrário. Além disso, a resposta a esses hormônios é mediada direta ou indiretamente pela expressão específica de cada célula de seus receptores.

Assim como em outras espécies, as células dos diferentes tecidos que formam o útero da égua sofrem variações cíclicas influenciadas pela ação dos hormônios esteróides estrógeno

e progesterona (WATSON et al., 1992; TOMANELLI et al., 1991). A observação de receptores hormonais nas diferentes fases do ciclo pode explicar a infertilidade causada por distúrbios endócrinos em éguas que não apresentam sinais clínicos associados a esta infertilidade (AUPPERLE et al., 2000).

Em um estudo realizado por Aupperle et al. (2000), com sete éguas durante um ciclo estral, foram observados RE e RP com reatividades diferentes dependendo dos níveis de estrógeno e progesterona circulante, bem como nos diferentes tipos celulares. No núcleo das células epiteliais da luz e ducto glandular, a reatividade para RE foi baixa em todo o ciclo estral. As glândulas apresentaram coloração máxima no diestro recente (dia 5 pós-ovulação) e reação mais baixa no diestro tardio (dia 13 pós-ovulação); a porção apical e média das glândulas reagiu menos do que a porção basal. No estroma, as células mostraram baixa reatividade durante todo o diestro, aumentando gradativamente no pró-estro e alcançando nível máximo no dia da ovulação. A expressão de RP mostrou-se fraca no epitélio luminal e ductal durante todo o ciclo. No epitélio glandular a expressão mostrou-se mais intensa durante o diestro recente, declinando durante o diestro e aumentando levemente até o estro. Houve uma variação intensa da expressão conforme a porção glandular. Nas células do estroma a imunorreatividade foi intensa somente no diestro tardio. As glândulas fibróticas apresentaram uma expressão mais fraca do que as não fibróticas dentro de uma mesma amostra, mas em um dos tecidos houve glândulas fibróticas muito coradas e outras pouco coradas, sugerindo uma má diferenciação glandular na endometrose. Nesse estudo o autor concluiu que assim como em outras espécies, o estrógeno estimula a presença de receptores enquanto a progesterona os inibe. A diferença de expressão entre as células do estroma e do epitélio pode sugerir uma influência do estroma sobre a expressão de receptores no epitélio.

Em trabalho realizado por Watson et al. (1992), foi observado que durante o estro, as células do estroma se coraram mais intensamente para RE e RP do que as células do miométrio, epitélio luminal e epitélio glandular. Durante o diestro a intensidade de coloração no estroma e no miométrio diminuiu. A coloração das células do epitélio luminal não se alterou durante as fases do ciclo. Em éguas suscetíveis à endometrite, durante o diestro, foi observada uma maior intensidade nos RE do que em éguas genitalmente normais.

Re et al. (1995), investigaram a concentração de RE e RP na mucosa uterina de éguas nas fases folicular e luteal, através da técnica de ensaio radiométrico, encontrando resultado diferente de outros autores. Nesse experimento não foi observada diferença significativa na concentração de RE nas duas fases do ciclo estral, tendo havido um aumento significativo na concentração de RP, que foi bem mais acentuada na fase folicular. Essas diferenças foram

atribuídas pelo autor ao método utilizado para identificação dos receptores, à época da colheita, bem como ao material ser proveniente de abatedouro, sem histórico reprodutivo.

Em estudo realizado por McDowell et al. (1999), foram coletadas amostras de endométrio de éguas em anestro, divididas em diferentes grupos: tratadas com veículo, tratadas apenas com estradiol, tratadas apenas com progesterona ou estradiol seguido de progesterona por curta ou longa duração. A quantidade de RE aumentou no grupo de éguas tratadas com estradiol mais do que no grupo tratado com estradiol seguido de progesterona de longa duração. A quantidade de RP não sofreu alteração nos dois grupos. Os autores observaram também, que a quantidade de receptores esteróides foi relativamente alta no grupo controle de éguas em anestro, não diferindo muito das éguas tratadas com estradiol e/ou progesterona, sugerindo que outros fatores além dos hormônios esteróides circulantes influenciem na regulação da expressão gênica destes receptores.

Hartt et al. (2005), detectaram altos níveis de RE e RP nas células do estroma, do epitélio luminal e do epitélio glandular do endométrio de éguas no dia zero e dia 20 do ciclo estral, com decréscimo no diestro tardio (dias 11 a 14). Os autores sugerem que a regulação dos receptores para estrógeno e progesterona durante o ciclo estral da égua é similar ao descrito em ovelhas e envolve alterações nos níveis circulantes de estrógeno e progesterona, somado à interação com os receptores. Essa hipótese é baseada nos altos níveis de RE e RP no endométrio durante o estro, declinando durante a fase luteal e tornando a aumentar quando ocorre a luteólise e a égua retorna ao cio. Provavelmente o declínio de RP seja responsável pela remoção do bloqueio da progesterona à síntese de RE, resultando no aumento da expressão de RE endometrial no dia 17, seguida pelo aumento da RP, que é mediada pela ação do estrógeno, no dia 20 do ciclo estral. Diferente dos resultados encontrados por Watson et al. (1992) e Aupperle et al. (2000), que detectaram uma intensidade baixa de RE e RP nas células do epitélio luminal e glandular, foi detectada uma intensa coloração no núcleo de todos os tipos celulares, tanto no estroma quanto nas células epiteliais no período próximo à ovulação.

Alm et al. (2009) utilizaram o útero de éguas em diferentes fases do ciclo estral como controle de anticorpos monoclonais. Os autores observaram que durante o estro houve uma grande proporção de células coradas para RE em todas as porções do útero, concordando com outros experimentos que mostraram uma ativação destes receptores pelo estrógeno, principalmente no estroma. A coloração para RP apresentou uma intensidade moderada em todos os tipos celulares, independente da fase do ciclo, sendo que a égua em diestro recente

apresentou a imunorreatividade mais fraca de todas, o que difere do observado por Hartt et al. (2005).

Aupperle et al. (2003) realizaram um estudo ultraestrutural e imunohistoquímico no endométrio de éguas com inatividade fisiológica e patológica. No endométrio inativo durante o anestro de inverno foi observado epitélio luminal cúbico simples, poucas glândulas retas e ramificadas com luz pouco visível e estroma denso com células grandes. Apesar de morfológicamente inativo, o endométrio apresentou receptores para estrógeno e progesterona que variaram individualmente. Já no endométrio com inatividade patológica durante a estação reprodutiva, a reatividade para RE e RP foi baixa e desigual.

Em um estudo feito com mulas, animais na maioria inférteis, Jäger et al. (2008) administraram progestágeno por 50 dias em duas mulas acíclicas para avaliar se houve influência do hormônio na morfologia funcional endometrial. Foram analisadas, através de imunohistoquímica, 28 biópsias uterinas desses dois animais, antes, durante e após aplicação de progesterona, para a presença de proteínas, RE, RP e Ki-67. Antes do tratamento, o endométrio das duas mulas apresentou-se inativo e com diferenciação irregular. Durante a medicação o epitélio glandular mostrou acentuada diferenciação secretora irregular. Após o término do tratamento, o endométrio voltou à morfologia anterior. O grau e o tipo de endometrose permaneceram inalterados. A expressão de receptores tanto de estrógeno quanto de progesterona, antes, durante e depois da aplicação de progestágeno, foi extremamente variável. Embora não tenha havido nenhuma influência hormonal na atividade ovariana, nem uma mudança significativa dos valores hormonais no plasma, houve um aumento contínuo e geral da expressão de receptores esteróides no epitélio glandular e no estroma endometrial das mulas acíclicas, sem que estas tenham recebido progestágeno. Este resultado foi semelhante ao observado por Aupperle et al. (2003), no endométrio de éguas durante o anestro de inverno. Durante e após a administração da progestágeno, foi observado um aumento na expressão de RE e RP, contudo o escore de imunorreatividade foi extremamente variável, diferindo dos encontrados em éguas tratadas por longo período com o hormônio. Nestes animais foi observada uma ação inibitória sobre os RE e RP durante o tratamento e um aumento expressivo após a descontinuação do mesmo. Os autores sugerem que a expressão destes receptores depende de mecanismos mais complexos.

A descoberta que o tratamento com estrógeno pode estimular a proliferação epitelial do útero, vagina e glândula mamária de camundongos no período neonatal, quando não há expressão de RE, sugere uma estimulação indireta da mitogênese epitelial pelo estrógeno (COOKE et al., 1998). Embora as células epiteliais do útero de camundongo recém nascido

não possuem RE detectável pelas técnicas de autorradiografia e de imunohistoquímica, as células do estroma uterino destes animais apresentam RE, o que pode indicar que a ação do E₂ seja indiretamente mediada pelos RE do estroma. Entretanto outras respostas epiteliais ao E₂ como a produção e secreção de proteínas e a queratinização e estratificação do epitélio vaginal parecem ser mais complexas, requerendo a expressão de RE no estroma e no epitélio (COOKE et al., 1998).

Vesanen et al. (1991), não encontraram diferença significativa nos níveis de RE e RP, entre o endométrio e o miométrio de vacas. Segundo os autores, isto pode indicar que os níveis de receptores são regulados de forma semelhante no miométrio e no endométrio desta espécie.

2.14. Presença de RLH no endométrio:

A presença de receptores para LH no citoplasma das células da granulosa e da teca, nos ovários, bem como das células de Leydig nos testículos é bem conhecida. Porém, nas últimas duas décadas foram descobertos receptores funcionais para LH/hCG distribuídos amplamente nos tecidos não gonadais, incluindo o miométrio, endométrio, oviduto, cérvix e vasos sanguíneos de suínos, bovinos, ratos, camundongos, coelhos e na espécie humana (ZIECIK et al. 1986; ZIECIK et al., 2005; FREIDMAN et al., 1995; ZHENG et al., 2001; STEPIEN et al., 2000; FIELDS & SHEMESH, 2004). Embora os níveis de RLH nos tecidos não gonadais sejam bem mais baixos do que nos ovários, o tamanho do útero, por exemplo, poderia resultar numa maior quantidade total destes receptores neste órgão em relação aos ovários (RAO & LEI, 2007; ZIECIK, 1986). No ligamento largo do útero em suínos também foram detectados RLH, localizados na camada muscular de artérias e veias. Geralmente todos os vasos, com exceção da artéria uterina, apresentaram altas concentrações de receptores, mais na fase luteal do que na fase folicular do ciclo, ao contrário do que ocorre na artéria ovariana (ZIECIK et al., 1995).

Em um estudo realizado por Derecka et al. (1995) com a técnica de RT-PCR, foi observada pela primeira vez a presença de receptores para LH/hCG no oviduto, endométrio e miométrio de porcas no meio da fase luteal do ciclo. Segundo ZieciK et al. (1992), no endométrio, o LH e ou hCG poderiam regular a função das células do epitélio luminal e glandular via modulação do cAMP ou por aumento da síntese de hormônios esteróides.

Rzucidlo et al. (1998) investigaram a presença de RLH/hCG no miométrio de porcas, durante o ciclo estral e no período gestacional, com a técnica de rádioreceptores em tecido uterino homogeneizado. A concentração máxima de receptores ocorreu na fase luteal do ciclo.

Durante a gestação, a maior afinidade dos receptores ocorreu durante os dias 35-40 e a concentração de receptores foi maior nos dias 65-70. Segundo os autores, a baixa concentração de RLH/hCG encontrada no início da gestação não está relacionada com a ocupação dos receptores, já que o nível de LH circulatório foi baixo neste período, sugerindo que este resultado tenha relação com a concentração de estrógeno e progesterona.

Os receptores de LH no endométrio alcançam sua expressão máxima na fase luteal, também nos ruminantes. Existe uma relação cronológica direta entre o aumento de receptores e o aparecimento de ciclooxigenase e seu produto associado, a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), pelas células do epitélio endometrial, o que pode indicar que o LH influencia, ao menos em parte, o início da luteólise em bovinos e suínos (STEPIEN et al., 1999; SHEMESH et al., 2001; ZIECIK et al., 2007). Segundo Ziecik et al. (2000), a liberação pulsátil de LH durante a fase luteal do ciclo estral poderia induzir a liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio. Por outro lado, a presença de blastocisto produzindo estrógeno aumentaria e manteria os receptores de LH no endométrio, garantindo uma alta taxa de PGE_2 e não de $PGF_{2\alpha}$, que tem ação luteolítica. Os RLH poderiam também estar envolvidos na produção de fator de crescimento endotelial, presentes no processo de implantação.

Blitek & Ziecik (2005), examinaram o efeito do LH na secreção da PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ em cultivo de células endometriais de porcas, em diferentes dias do ciclo estral. O LH estimulou a secreção pelas células do estroma após seis horas de incubação. Já as células epiteliais demoraram 12 horas para secretarem $PGF_{2\alpha}$. Os autores concluem que o LH causa um efeito estimulante na liberação de $PGF_{2\alpha}$, podendo ter um papel importante na indução da luteólise.

Reshef et al. (1990) investigaram a presença de RLH/hCG no útero, placenta e membranas fetais, em humanos, pelo método de imunohistoquímica. Foi observada a presença desses receptores no epitélio luminal e glandular, bem como no estroma do endométrio. No miométrio foram observados receptores nas fibras musculares circulares e longitudinais, bem como nas fibras musculares da parede vascular. A intensidade de imunorreatividade foi maior nas células epiteliais do que no estroma. As células musculares mostraram menor reatividade do que as células do estroma. Foi observada uma maior imunorreatividade de todos os tipos celulares no diestro em detrimento do estro. Também houve reatividade na placenta, membranas fetais e células decíduais, indicando, segundo os autores, que o LH/hCG podem regular diretamente as funções destes tecidos por mecanismos endócrino, autócrino ou parácrino. LaPolt et al. (1991) observaram uma retroalimentação negativa dos RLH pelo hormônio homólogo, nas células de Leydig e nas células da granulosa de ratos.

Vários modelos têm sido propostos sobre a função desses receptores, considerando que sua expressão é dinâmica, sofrendo alterações durante o ciclo estral (FIELDS & SHEMESH, 2004). Zheng et al. (2001), observaram a presença de RLH nas células do estroma endometrial e na serosa uterina de camundongos. Porém o miométrio apresentou baixa expressão e no epitélio não foi observada a presença de receptores para LH.

Flowers et al. (1991) examinaram o efeito do estrógeno e progesterona na concentração de receptores para LH/hCG no músculo liso uterino “in vivo” e o efeito do hCG na contração espontânea do miométrio “in vitro”, em porcas ovariectomizadas. O tratamento com benzoato de estradiol aumentou significativamente os sítios de ligação para LH/hCG em comparação com o útero das porcas que receberam óleo de milho ou progesterona. A incubação do miométrio com hCG reduziu a frequência e amplitude das contrações uterinas espontâneas nas porcas que haviam recebido estradiol e não alterou a contração naquelas que receberam progesterona ou óleo de milho. Os autores sugerem que o estradiol promove a síntese de RLH/hCG no miométrio da porca, causando um efeito indutor de quiescência no miométrio. Também é possível, segundo os autores, que a ação estimulatória do estradiol na concentração de RLH/hCG seja comum a todas as células do organismo que tenham estes receptores, já que o mesmo efeito foi observado no corpo lúteo e nas células da granulosa.

O nível de RLH no endométrio e miométrio é máximo durante a fase luteal, entretanto na veia uterina e no oviduto, o RLH é expresso principalmente durante a fase folicular. Estas diferenças podem estar relacionadas à regulação autócrina-parácrina da quantidade de receptores, por fatores locais como, por exemplo, cálcio, estrógeno e prostaglandinas (FIELDS & SHEMESH, 2004).

A presença de receptores para LH no miométrio de diferentes espécies, com expressão alta na fase luteal e muito fraca na fase folicular, têm sido relacionada com a hipertrofia e hiperplasia do útero bem como com a sua mobilidade (ZIECIK et al., 1992). Embora Freidman et al. (1995) não tenham conseguido demonstrar a presença de RLH no miométrio de bovinos, Shemesh et al., 2001 evidenciaram a presença destes receptores e observou que a expressão também foi maior durante a fase luteal. Os autores sugerem que a ativação das rotas da adenilciclase e da fosfolipase C pelo LH esteja relacionada com a quantidade de RLH presente no tecido. Além disso, a ativação do AMPc pelo LH também poderia servir para tornar o útero quiescente durante a fase luteal.

A importância de receptores extragonadais na fisiologia da reprodução foi contestada em trabalho realizado por Pakarainen et al. (2005; 2007). Os autores utilizaram camundongos transgênicos sem RLH e transplantaram para eles ovários de animais normais, observando que

o aparelho reprodutor se desenvolveu normalmente apesar da ausência de RLH extragonadais. Baseado nestes resultados e na ausência de pesquisas “in vivo” que pudessem comprovar a ação destes receptores, os autores sugeriram que a presença de RLH em órgãos extra-gonadais do aparelho reprodutor, bem como de outros tecidos como glândula mamária e tecido nervoso, não tenham função útil. Já Chudgar et al. (2005) não observaram esta redundância fisiológica e encontraram resultado diferente em seus estudos com camundongos transgênicos sem RLH.

Segundo Rao & Lei (2007), o útero é o órgão que tem mais dados sobre a importância do RLH entre os órgãos não gonadais. Os autores sugeriram que a presença de RLH no útero possa estar relacionada com o início e manutenção da gestação.

Para Rahman & Rao (2009) a pesquisa básica e clínica desenvolvida nos últimos anos sobre os receptores para LH/hCG extragonadal estende o potencial de uso destes hormônios para várias indicações clínicas. A manipulação de camundongos transgênicos sem a presença desses receptores ou com excesso de receptores tem permitido um melhor entendimento sobre a biologia dos hormônios gonadotrópicos, como a infertilidade causada em ambos os sexos pela falta de LH (KUMAR, 2005).

2.15. Morfofisiologia da cérvix:

A cérvix é uma continuação anatômica das tubas uterinas e do útero, sendo derivada do mesmo sistema de ductos Mülllerianos. Ela tem um papel importante no transporte do espermatozoide para o trato genital superior, na manutenção do feto dentro do útero até o final da gestação, permitindo então, sua livre passagem para o meio externo no parto e representa também, um importante mecanismo de defesa através da sua mucosa (LIN et al., 2003). A cérvix uterina é uma estrutura semelhante a um esfíncter, que se projeta caudalmente na cavidade vaginal (HAFEZ, 1995), podendo ser sentida através da parede vaginal (SISSON, 1986).

A anatomia cervical difere significativamente entre as espécies. Na égua o canal cervical não possui anéis, mas apresenta inúmeras pregas frouxas longitudinais na mucosa que são contínuas com as pregas endometriais e se estendem na porção vaginal da cérvix. Durante a cópula, o pênis do garanhão pressiona a cérvix macia. O sêmen então é ejaculado sob alta pressão diretamente no útero (KAINER, 1993; SENGER, 2003).

Na égua, exames com vaginoscópio da porção vaginal da cérvix revelam variações anatômicas funcionais correlacionadas com a atividade ovariana e mudanças comportamentais durante o ciclo estral. No pró-estro as pregas começam a aumentar e a mucosa fica levemente

congesta. Durante o cio, a cérvix da égua fica completamente relaxada, caindo ventralmente; as pregas estendem-se pelo orifício uterino externo aumentado. Nesta fase, a congestão da mucosa é homogênea e intensa e as secreções cervicais são abundantes (KAINER, 1993). No diestro, o canal cervical se contrai, torna-se firme e estende-se caudalmente, ficando ocluído por um tampão mucoso; as pregas ficam menores e não há mais congestão da mucosa (KAINER, 1993; McDONALD, 1989). Durante a gestação a função da cérvix é isolar o conteúdo do meio externo (SENGER, 2003). O arranjo de fibras elásticas e colágenas juntamente com as fibras musculares da parede, permite a extrema dilatação da cérvix durante o parto (KAINER, 1993). Quando a égua está sob influência da progesterona, as secreções uterinas, cervicais e vaginais são escassas e pastosas. Durante o anestro, com pouca ou nenhuma atividade ovariana ou na ausência de esteróides ovarianos, como resultado de ovariectomia, a cérvix, assim como o útero, perde seu tônus muscular e se torna não edematosa e flácida. A maioria das éguas nesta fase possui a cérvix fechada (DAELS et al., 1993).

O epitélio luminal da cérvix é cilíndrico simples, com células ciliadas e mucossecretoras. A lâmina própria-submucosa é formada por tecido conjuntivo com grande quantidade de fibras elásticas e vasos sanguíneos. A camada muscular é rica em fibras elásticas e é dividida em circular interna e longitudinal externa, continuando-se com a camada muscular do útero e vagina (BANKS, 1991; BACHA & BACHA, 1990).

As funções contrastantes da cérvix, dependendo da fase do ciclo, e a sua função durante a gestação e o parto requerem numerosas modificações bioquímicas e morfológicas, que provavelmente são controladas por hormônios circulantes e moléculas teciduais. Isto inclui hormônios esteróides e protéicos, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico. Embora existam muito menos estudos sobre a cérvix em relação às tubas uterinas e ao útero, os fatores regulatórios parecem ser os mesmos para os três órgãos (LIN et al., 2003).

2.16. Presença de RE e RP na cérvix:

O núcleo do epitélio luminal da cérvix da mulher, tanto na idade reprodutiva quanto na menopausa, apresenta uma intensa coloração para RE. As células do estroma apresentam coloração menos intensa, da metade para o final da fase secretora. Nos vasos sanguíneos, não há coloração das células endoteliais. Estas observações evidenciam que tanto os receptores ocupados quanto os não ocupados se coram da mesma forma (PRESS et al., 1986).

Snidjers et al. (1992) observaram uma intensa reação no núcleo das células mucossecretoras da cérvix, tanto para RE quanto para RP, durante todas as fases do ciclo

menstrual. A expressão de RP foi levemente mais alta no final da fase proliferativa. Após a menopausa houve uma imunorreatividade intensa para RE e moderada para RP. As células musculares e do estroma mostraram expressão constante e moderada de RE e RP durante todas as fases do ciclo e também após a menopausa, quando a concentração plasmática de estrógeno é positiva. Os autores sugerem que a secreção de muco cervical pré-ovulatório está diretamente relacionada com a expressão desses receptores, já que mulheres inférteis, com pouca secreção de muco cervical podem ter baixa expressão de RE e/ou RP nas células epiteliais cervicais (ABUZEID et al., 1987).

Wang et al. (2000), observaram que na cérvix de ratas, os níveis de mRNA de RE nas células do estroma e do epitélio aumentaram logo após o estro e durante o diestro. No estroma a expressão de RE foi mais evidente nas células da camada basal e parabasal. Foi observada também, uma maior variação no nível de receptores nas células do epitélio luminal do que no estroma, durante todo o ciclo estral.

Re et al. (1995), encontraram uma concentração de RE e RP na cérvix da égua, bem mais baixa do que no útero, principalmente em comparação com os cornos. Segundo os autores esta diferença pode estar relacionada com a menor necessidade de receptores na cérvix do que no útero, pelas funções que este exerce na reprodução.

Vesanen et al. (1991) encontraram uma concentração de RP e RE um pouco menor na cérvix do que no útero de vacas, porém esta diferença não foi significativa. Segundo o autor, os dados encontrados neste experimento indicam que a cérvix uterina também é um tecido alvo para os hormônios esteróides. Esta constatação é corroborada pela percepção de que a cérvix sofre alteração na conformação dependendo do nível de progesterona circulatória, podendo indicar que a cérvix da vaca, diferente da cérvix humana, é altamente dependente de progesterona. Em um estudo realizado por Schmitz et al. (2006) em cérvix de ovelhas ovariectomizadas, foi constatado que a reposição de estradiol diminuiu os receptores de PGE₁ e PGE₃ na média dos vasos sanguíneos e do estroma, e diminuiu a expressão de receptores de PGE₁ na camada muscular longitudinal. A reposição de progesterona não teve ação sobre os receptores de PGE. Segundo os autores, o efeito inibitório do estradiol sobre as PGE₁ e PGE₃ poderia facilitar o efeito vasodilatador dependente de PGE₂ e PGE₄, promovendo assim as alterações arteriais induzidas pela PGE₂, produzindo edema e infiltração de leucócitos durante o processo de dilatação cervical, enquanto as alterações musculares poderiam facilitar o relaxamento do músculo liso e conseqüente dilatação cervical. Mesmo uma pequena variação na expressão de receptores cervicais para PG poderia ser suficiente para provocar alterações fisiológicas na resposta vascular à PGE₂. Estudos sugerem que os receptores de PGE₄ mediam

os efeitos da PGE_2 na dilatação cervical. A queda na expressão de receptores para PGE_1 e PGE_3 no estroma após reposição de estradiol poderia representar um mecanismo secundário de ação do estradiol na dilatação cervical.

2.17. Presença de RLH na cérvix:

Na cérvix bovina, foram observados altos níveis de LHR durante a fase luteal do ciclo; na fase folicular a expressão destes receptores foi baixa, semelhante ao observado no endométrio e miométrio (SHEMESH et al., 2001). Já na cérvix da porca, o RLH/hCG está presente apenas no epitélio, sem variação da expressão nas diferentes fases do ciclo estral, com exceção do início da fase luteal, quando a concentração é muito reduzida (STEPIEN et al., 2000).

Lin et al. (2003) demonstraram, através das técnicas de hibridização “in situ” e imunohistoquímica, a presença abundante de RLH/hCG tanto na ectocérvix, porção da cérvix em contato com a vagina, com epitélio pavimentos estratificado, quanto na endocérvix, com epitélio cilíndrico mucossecretor, na mulher. Além do epitélio, foi observada presença de receptores na parede vascular e no músculo liso. O nível de receptores foi mais alto na endocérvix do que na ectocérvix. Neste experimento, não foi possível avaliar se há variação na quantidade de receptores nas diferentes fases do ciclo e na menopausa. A ativação dos receptores resultou no aumento do nível médio de AMPc, como no útero e tuba, e na diminuição tecidual de COX-2 na endocérvix, ao contrário do que ocorre nos outros dois órgãos. Os autores admitem que embora a cérvix contenha RLH/hCG funcional, isto não necessariamente significa que os hormônios LH/hCG regulem as funções cervicais. É possível, entretanto, que o aumento do LH na circulação durante o período periovulatório, além de produzir a ovulação possa também ativar receptores nas células epiteliais da cérvix, aumentando a secreção cervical. Esta ação do LH poderia ser sinérgica com o estrógeno. A presença de receptores nos vasos e no músculo liso poderia estar associada com a regulação do fluxo sanguíneo e da motilidade deste órgão. A ação do hCG de manter a gestação poderia incluir a ação cervical de prevenir o parto prematuro, através de uma ação inibitória sobre a liberação de COX-2, com conseqüente inibição da PGE_2 , que promove a dilatação cervical.

Segundo Ziecik et al. (2005), o LH poderia aumentar a produção de PGE_2 na cérvix, assim como ocorre em outros órgãos do trato reprodutivo. A produção de PGE_2 causa abertura cervical pelo aumento da colagenólise na matriz extracelular, mas na fase luteal, provavelmente ela se ligue a outro subtipo de receptores para prevenir a abertura da cérvix, já que dois subtipos de receptores para PGE_2 são encontrados na cérvix: um inibitório e outro

estimulatório do relaxamento e dilatação cervical. Segundo os autores, o LH/hCG provoca o relaxamento da cérvix durante o estro, para facilitar a penetração do esperma e deposição do ejaculado. Fields & Shemesh (2004), observaram a ação contraditória do LH, induzindo a PGHS2 no oviduto e no útero, e inibindo-a na cérvix, o que pode refletir uma diferença no papel do LH na função cervical.

3. ARTIGOS

3.1. Artigo 1. Immunohistochemical identification of luteinizing hormone receptors in the extra-gonadal reproductive tract of the mare.

Identificação Imunohistoquímica de Receptores para Hormônio Luteinizante no Trato Reprodutivo Extra-gonadal da Égua.

Anamaria Telles Esmeraldino^{1,3}, Eduardo Malschitzky¹, Sandra Fiala², Luisiane Santarém¹, Caroline Wolff³, Maria Inês Jobim³, Ricardo Gregory³, Rodrigo C. Mattos^{3,4}

1 - Curso de Medicina Veterinária, ULBRA, Canoas, Brasil

2 - Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – UFPEL, Pelotas, Brasil

3 - REPROLAB/ Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

4 - Pesquisador do CNPq

Resumo

Os receptores para hormônio luteinizante (RLH) têm sido observados nos tecidos do trato reprodutivo extragonadal de várias espécies, no entanto não há estudos sobre a presença e localização destes receptores nos equinos. O objetivo deste estudo foi identificar RLH e comparar sua distribuição e imunorreatividade no trato reprodutivo extragonadal de éguas nas diferentes fases do ciclo estral e durante o anestro de inverno. Amostras do oviduto, útero e cérvix de 41 éguas sem raça definida, nas fases de estro, diestro e anestro foram coletadas em um abatedouro localizado no Sul do Brasil. A técnica utilizada para detecção dos receptores foi a imunohistoquímica pelo método de peroxidase-antiperoxidase. Para calcular o escore de imunorreatividade, foi utilizado um índice multiplicativo levando em consideração a proporção de células coradas e a intensidade de coloração, proposto por Detre et al. (1995). Foi observada presença de receptores para LH em todos os tecidos examinados. Houve diferença de reatividade entre os tecidos nas fases do ciclo e no anestro, sugerindo o envolvimento deste hormônio na função reprodutiva da égua. Em outras espécies, os estudos sugerem a ação do LH no controle das contrações do oviduto, estímulo do crescimento e hiperplasia do miométrio, relaxamento da motilidade uterina e aumento da produção de prostaglandinas pelo endométrio, oviduto e vasos.

Palavras-chave: immuno-histoquímica, trato reprodutivo da égua, receptores para hormônio luteinizante, ciclo estral, anestro.

Abstract

The receptors for luteinizing hormone (LHR) are widely distributed in non-gonadal tissues in the female reproductive tract of many species, but there were not studies about its presence in equine species. The aim of this study was to identify receptors for LHR and compare their distribution in the extra-gonadal reproductive tract of the mare in anestrus and during the breeding season. The oviduct, uterus and cervix strains were collected in an abattoir in Southern Brazil, from 41 criollo mares with unknown reproductive histories, during estrus, diestrus and anestrus. Immunohistochemistry was performed using the peroxidase-antiperoxidase technique. To compare LHR intensities, the estrogen receptor Quickscore proposed by Detre et al. (1995) was used. The LHR was demonstrated in all examined tissues, with different reactivity through the cycle and anestrus, suggesting involvement of this hormone in the mare reproductive function. In other species, the studies suggest a role of LH in modulating oviduct contraction, in stimulating growth and hyperplasia of myometrium, in relaxation of uterine and cervix motility and increasing production of prostaglandin in endometrium, oviduct and blood vessels.

Keywords: immunohistochemistry, reproductive tract of mare, luteinizing hormone receptors, estral cycle, anestrus.

Introdução

Os receptores de hormônio luteinizante (RLH) estão amplamente distribuídos nas células gonadais das fêmeas, assim como em tecidos não gonadais de várias espécies (SHEMESH et al., 2001; ZIECIK et al., 2007). Entretanto não existem relatos da detecção destes receptores no trato reprodutivo da égua.

Estudos através da técnica de imunohistoquímica revelaram a presença de RLH no epitélio, células do músculo liso e vasos sanguíneos do oviduto de porcas. Em contraste, no oviduto de camundongos, foram detectados receptores na serosa e nas células subepiteliais, mas não no epitélio (ZHENG et al., 2001), refletindo diferenças entre as espécies.

O nível de hormônio esteróide pode influenciar a expressão de receptores no oviduto suíno (GAWRONSKA et al., 1999), miométrio (ZIECIK et al., 1992) e endométrio (WASOWICZ & ZIECIK, 2000) e no endométrio bovino (FRIEDMAN et al., 1995). Em suínos e bovinos o alto nível de RLH endometrial próximo ao período da luteólise sugere um possível papel do LH na síntese de prostaglandina (ZIECIK et al., 2007). O LH induz a expressão da ciclooxigenase (COX) e aumenta a liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGLF_{2\alpha}$) no

endométrio bovino (SHEMESH et al., 1994). O relaxamento e abertura da cérvix é parcialmente mediada por prostaglandinas (FUCHS et al., 1984) e RLH tem sido observados na cérvix bovina (MISRACHI & SHEMESH, 1999).

O objetivo deste estudo foi identificar RLH e comparar sua distribuição no trato reprodutivo extragonadal de éguas em anestro e durante a estação reprodutiva.

Materiais e Métodos:

Animais:

Foram coletadas amostras de útero, cérvix e oviduto, de 41 éguas sem raça definida e com histórico reprodutivo desconhecido, em um abatedouro localizado no sul do Brasil. As amostras foram classificadas macroscopicamente, de acordo com a fase do ciclo estral em que os animais se encontravam no momento do abate. Para tanto foram observados o tamanho dos folículos ovarianos, a presença de corpo lúteo e a conformação do endométrio. As éguas foram consideradas em estro quando havia um folículo dominante (> 35mm.) e edema endometrial evidente, foram classificadas em diestro quando havia um corpo lúteo evidente ou corpo hemorrágico nos ovários, pela identificação de um colo uterino contraído e sem hiperemia e pela presença de edema pouco pronunciado. Foram consideradas em anestro, as éguas que apresentaram folículos menores que 20mm e ausência de corpo lúteo. As amostras de endométrio e miométrio foram retiradas em um mesmo corte do corpo uterino, próximo ao corno esquerdo. As amostras da cérvix foram retiradas de sua porção junto ao útero (endocérvix) e as amostras de tuba uterina foram coletadas de diferentes segmentos. Logo após a coleta, o material foi fixado em formol tamponado a 4% por até 48 horas.

Histologia:

Após fixação, os tecidos foram processados, incluídos em parafina e cortados em micrótomo, a uma espessura de 4µm. Os cortes foram corados pela coloração de hematoxilina-eosina e analisados sob microscopia óptica, para confirmar a fase do ciclo e analisar a morfologia dos tecidos.

Imunohistoquímica:

A técnica de peroxidase anti-peroxidase foi utilizada para localizar os receptores de LH nos tecidos. As lâminas utilizadas foram previamente tratadas com Histogrip®, uma substância que mantém os corte aderidos durante o processamento. Os cortes foram

reidratados e colocados em uma cuba com solução tampão de tris-EDTA, para recuperação antigênica (“retrievel”), com o objetivo de recuperar as estruturas que poderiam ter sido danificadas com a fixação do tecido em formol. Esta cuba ficou imersa em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 96°C. Após esta etapa os cortes foram colocados em uma solução a 5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol por 30min. para inibição da peroxidase endógena. A seguir passaram por uma solução bloqueadora de antígenos inespecíficos por 10 min. (Histostain® - plus). Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho anti-RLH humano (Santa Cruz Biothecnology, Inc.) diluído a 1:200 em solução tampão, por 1h em temperatura ambiente. Para controle negativo, os cortes foram incubados apenas na solução tampão, sem o anticorpo. A ligação do anticorpo com o RLH foi detectada através do complexo ABC (Santa Cruz Biothecnology, Inc.). Os receptores presentes no tecido foram revelados com a aplicação do cromógeno tetra-hidroclorato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Finalmente os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, clarificados em xilol e montados com Entelan®. Entre todas as etapas foram feitas lavagens com uma solução tampão de fosfato salino (PBS) com pH 7,0.

Análise Imunohistoquímica:

A reação imunohistoquímica foi avaliada sob dois aspectos, a intensidade e a proporção de células coradas. O método de avaliação utilizado neste experimento foi o proposto por Detre et al. (1995), denominado “quickscore”. A proporção de células coradas positivamente foi definida através da análise de 10 campos, em aumento de 400x, e dividida em escores de 1 a 6 (1 = 0-4%; 2 = 5-19%; 3 = 20-39%; 4 = 40-59%; 5 = 60-79%; 6 = 80-100%). A intensidade média, correspondendo à presença de coloração negativa (0), fraca (1), intermediária (2) e forte (3) foi avaliada e foi aplicado um índice multiplicativo (proporção de células coradas x intensidade de coloração). Somente foi considerada a coloração do citoplasma, que é a localização do RLH.

Análise Estatística:

Os dados foram analisados usando ANOVA, com significância estatística de 95% ($P < 0.05$). Como variável dependente foi utilizado o escore imunohistoquímico para epitélio e músculo do oviduto; miométrio, epitélio glandular e epitélio luminal do útero; epitélio e músculo da cérvix. A análise estatística do experimento foi conduzida usando GraphPad InStat 3.0.

Resultados:

Oito éguas foram classificadas como estando em anestro, 15 em estro e 18 em diestro. Somente foram consideradas as colorações no citoplasma e membrana celular. A reação imunohistoquímica nos tecidos da cérvix, do oviduto e do endométrio está demonstrada na fig. 1. Os resultados dos achados de imunohistoquímica são mostrados na tabela 1.

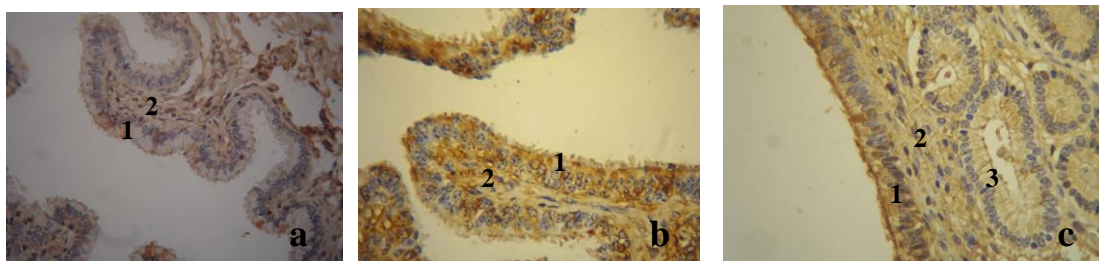


Fig.1: Fotomicrografias da expressão de RLH a) cérvix; b) oviduto c) endométrio. 1) epitélio luminal; 2) estroma; 3) epitélio glandular.

Tabela 1: Escore imunohistoquímico de receptores para LH no trato reprodutivo extragonadal de éguas em anestro, estro e diestro.

Órgão/tecido	Anestro	Estro	Diestro	<i>P</i>
Oviduto				
Epitélio	9,7 ± 3,1	8,0 ± 5,9	7,7 ± 4,9	0,61
Músculo	3,0 ^a ± 4,5	4,4 ± 4,2	7,3 ^b ± 4,8	0,05
Útero				
Miométrio	3,0 ± 3,2	6,8 ± 5,0	6,0 ± 3,6	0,11
Epitélio glandular	0,7 ^a ± 2,1	3,2 ± 4,5	5,5 ^b ± 5,3	0,05
Epitélio luminal	6,0 ± 3,2	8,4 ± 5,0	8,8 ± 5,9	0,43
Cérvix				
Epitélio	8,2 ± 4,5	8,8 ± 5,0	9,3 ± 5,5	0,88
Músculo	3,7 ± 5,5	4,4 ± 3,6	6,3 ± 4,8	0,31

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Discussão

Nossos resultados demonstram a presença de receptores para LH nos diferentes tecidos da cérvix, oviduto e útero da égua. Este é o primeiro relato sobre a expressão de RLH no trato reprodutivo extragonadal desta espécie. O hormônio luteinizante pode estar envolvido na modulação da contração uterina, bem como no relaxamento do oviduto e da cérvix. O padrão dinâmico da expressão deste receptor no útero de várias espécies indica que as gonadotrofinas podem ter um papel substancial na regulação do ciclo estral (SHEMESH,

2001). Neste estudo foram observadas diferenças na imunorreatividade entre o anestro e as fases do ciclo estral, sugerindo que os esteróides ovarianos possam afetar a expressão de RLH. Esta constatação também foi feita por outros autores (RZUCIDLO et al., 1998; FLOWERS et al., 1991).

A presença de RLH no oviduto de porcas e as alterações na quantidade de receptores conforme o status hormonal dos animais sugere que o LH possa ser um fator importante na sincronização dos eventos que levam à fertilização do óvulo na ampola. O LH pode também facilitar a passagem dos embriões através do istmo em direção ao útero. Estudos em tecidos colhidos de porcas cíclicas revelaram que o LH causou relaxamento do oviduto, especialmente no período periovulatório (GAWRONSKA et al., 1999). A imunorreatividade para RLH no músculo liso do oviduto foi mais pronunciado em éguas no diestro do que em anestro, sugerindo que o LH possa exercer um papel importante nos eventos que afetam o embrião durante sua passagem pelo oviduto em direção ao útero.

A maior imunorreatividade observada no epitélio glandular do endométrio de éguas no diestro em relação ao anestro sugere que o LH possa ter um importante papel como regulador molecular autócrino-parácrino da composição protéica das secreções endometriais.

Os receptores de LH estão presentes também no endométrio, miométrio e cérvix de várias espécies (SHEMESH et al., 2001; RZUCIDLO et al., 1998; MIZRACHI & SHEMESH, 1999). Embora estes autores tenham observado uma maior expressão do RLH durante o diestro, Stepien et al. (2000) não observaram variação significativa na concentração de RLH durante o ciclo estral da porca.

Neste estudo, embora a expressão de RLH tenha se mostrado mais alta no epitélio glandular do endométrio e no músculo do oviduto durante o diestro em relação ao anestro, não foi observada diferença significativa entre o estro e o diestro. Estas diferenças podem ser explicadas pelas variações que ocorrem entre as espécies, pela técnica utilizada para detecção dos receptores e também pela ausência de informações sobre o dia do ciclo em que as éguas se encontravam no momento da retirada das amostras, já que se tratava de animais de abatedouro.

A presença de RLH no trato genital extragonadal e as diferenças observadas entre as éguas cíclicas e não cíclicas sugere um papel para o LH na regulação funcional destes órgãos, indicando a necessidade de estudos subsequentes para elucidar outras funções do LH.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo financiamento deste estudo

3.2. Artigo 2 – Distribution of LH receptors in the genital tract of mares with endometriosis.

Distribuição de receptores para LH no trato genital de éguas com endometrose

Anamaria Telles Esmeraldino^{1,3}, Eduardo Malschitzky¹, Luisiane Santarém¹, Sandra M Fiala², Caroline A Wolff³, Maria Inês M Jobim³, Ricardo M Gregory³, Rodrigo C Mattos^{3,4}
atelles@portoweb.com.br

1 - Curso de Medicina Veterinária, ULBRA, Canoas, Brasil.

2 - Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – UFPEL, Pelotas, Brasil.

3 - REPROLAB/ Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

4- Pesquisador do CNPq.

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar a imunorreatividade de receptores para hormônio luteinizante (RLH) nos diferentes tecidos do trato reprodutivo extragonadal de éguas com e sem endometrose, durante o ciclo estral. Nas amostras de endométrio com endometrose verificou-se também se havia diferença de imunorreatividade nas glândulas com fibrose. Foram coletados útero, cérvix e oviduto de 33 éguas sem histórico reprodutivo conhecido, em um abatedouro. O método utilizado para detecção dos receptores foi imunohistoquímica, pela técnica de peroxidase anti-peroxidase. Embora não tenha havido diferença significativa entre a reatividade para RLH nos diferentes tecidos entre os dois grupos de éguas, observou-se variação acentuada de imunorreatividade entre as amostras de um mesmo grupo. Provavelmente este resultado seja reflexo da variação entre o dia do ciclo em que os animais se encontravam, bem como da complexidade dos mecanismos envolvidos na presença dos receptores. Em algumas amostras de endométrio de éguas com endometrose observou-se reatividade desigual no epitélio glandular no interior de focos fibróticos em relação às áreas saudáveis, evidenciando má diferenciação glandular. Estes achados sugerem independência do foco fibrótico em relação ao mecanismo de controle hormonal do útero. É provável que a presença de endometrose possa interferir na ação do LH nos diferentes tecidos do trato reprodutivo da égua, já que a sincronização do ciclo e a função reprodutiva como um todo dependem de uma perfeita interação entre os hormônios e os tecidos do trato reprodutivo. Os receptores de hormônio luteinizante têm sido encontrados no trato reprodutivo extra-gonadal de várias espécies e alguns estudos indicam a importância do LH na movimentação do oviduto, na produção de prostaglandinas pelo útero, levando à luteólise, e também no relaxamento do útero, da cérvix e do oviduto. Na égua, este é o primeiro relato comparando a imunorreatividade destes receptores em éguas com e sem a presença de endometrose. Esta patologia causa comprovada diminuição da capacidade reprodutiva na espécie equina.

Palavras-chave: receptores para LH; cérvix; útero; oviduto; imunohistoquímica; égua.

Distribution of LH receptors in the genital tract of mares with endometrosis.

Abstract

The aim of this study was to compare the reactivity for luteinizing hormone receptors (LHR) in different tissues of the mare genital tract with and without endometrosis, during endometrial cycle. Another objective was to verify the staining intensity within and without the fibrotic focus. Uterus, cervix and oviduct of 33 criollo cyclic mares with unknown reproductive histories were collected in an abattoir. Immunohistochemistry was performed using the peroxidase anti-peroxidase technique (PAP). In this study there was no significant difference in immunoreactive score for LHR in endometrium with or without endometrosis, but fibrotic glands showed different expression patterns of LHR, could evidence for functionally glandular maldifferentiation in endometrosis. These results suggest an independency of fibrotic foci from the hormonal control mechanism of the uterus. It was found marked individual variation among the strains. These results probably were caused by the variation among the day of cycle and the complexity of mechanisms involved in the presence of these receptors. The presence of endometrosis could interfere in the action of LH directly in the endometrium and in the others tissues of the reproductive organs, because the synchronization of cycle and the reproductive function depends of a perfect interaction between the hormones and the tissues of reproductive tract. The LH receptors are widely distributed in non-gonadal tissues in the female reproductive tract of many species and some studies suggests the importance of this hormone in the oviduct movement, in the prostaglandins uterine synthesis causing luteolysis and relaxation of cervix, uterus and oviduct muscles. This is the first study comparing the imunoreactivity for RLH in mares with and without endometrosis. This pathology cause proven poor reproductive capacity in mares.

Keywords: luteinizing hormone receptors, oviduct, uterus, cervix, immunohistochemistry, mare

Introdução:

A endometrose na égua é definida como a fibrose endometrial ativa ou inativa, no estroma e ao redor das glândulas do endométrio, incluindo alterações glandulares dentro de focos fibróticos (SHOON et al., 1995). Há relatos sobre as alterações protéicas que ocorrem na secreção uterina de éguas com endometrose (MALSCHITZKY et al., 2008; HOFFMANN et al., 2003), sugerindo que o endométrio afetado pode não ser capaz de prover nutrientes em quantidade ou qualidade adequada para manter o embrião até a nidação (HOFFMANN et al., 2009b). Embora as alterações da secreção uterina só sejam observadas nos casos de endometrose mais severa, a identificação imunohistoquímica permite um estudo mais detalhado do epitélio glandular dentro dos ninhos fibróticos (HOFFMANN et al., 2009a).

O endométrio de éguas com endometrose apresenta variabilidade na expressão glandular, para receptores de hormônios esteróides ovarianos dentro de focos fibróticos, com a coexistência de glândulas mais coradas e outras menos coradas (AUPPERLE et al., 2000; HOFFMANN et al., 2009a). No entanto, não há relatos sobre a diferença de expressão de

receptores para LH em glândulas fibróticas do endométrio de éguas com endometrose, nem sobre a possível relação da endometrose com a expressão destes receptores em outros órgãos do aparelho reprodutor.

Os receptores do hormônio luteinizante (RLH) estão amplamente distribuídos nas células gonadais, assim como em tecidos não gonadais de diversas espécies (SHEMESH et al., 2001; ZIECIK et al., 2007). A função deste hormônio no útero pode estar relacionada com a síntese de prostaglandina (ZIECIK et al., 2007) e indução da expressão da ciclooxigenase (SHEMESH et al., 1994). Já a presença de RLH na cérvice pode estar relacionada com a síntese de prostaglandinas, que auxiliam no relaxamento e abertura da cérvice em bovinos, ovinos e humanos (FIELDS & SHEMESH, 2004). A presença de RLH no oviduto de porcas e alterações na quantidade de receptores dependendo do status hormonal dos animais sugere que o LH possa ser um fator importante na sincronização dos eventos que levam à fertilização do óvulo na ampola (GAWRONSKA et al., 1999).

Foi observada uma alta imunorreatividade no epitélio glandular do endométrio e no músculo do oviduto de éguas cíclicas comparado com éguas em anestro, sugerindo que este hormônio possa exercer um papel substancial como regulador molecular parácrino-autócrino na composição protéica da secreção endometrial nesta espécie (ESMERALDINO et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi comparar, através da imunohistoquímica, a expressão de RLH nos diferentes tecidos do trato extragonadal da égua com e sem endometrose.

Materiais e Métodos:

Animais:

Foram coletadas amostras de útero, cérvice e oviduto, de 33 éguas sem raça definida e com histórico reprodutivo desconhecido, em um abatedouro localizado no sul do Brasil. As amostras foram classificadas macroscopicamente, de acordo com a fase do ciclo estral em que os animais se encontravam no momento do abate. Para tanto foram observados o tamanho dos folículos ovarianos, presença de corpo lúteo e conformação do endométrio. As éguas foram consideradas em estro quando havia um folículo dominante (> 35mm.) e edema endometrial evidente, e foram classificadas em diestro quando havia um corpo lúteo evidente ou corpo hemorrágico nos ovários, pela identificação de um colo uterino contraído e sem hiperemia e pela presença de edema pouco pronunciado. As amostras de endométrio e miométrio foram

retiradas em um mesmo corte do corpo uterino, próximo ao corno esquerdo. As amostras de cérvix foram retiradas de sua porção junto ao útero (endocérvice) e as amostras da tuba uterina foram retiradas de diferentes segmentos. Logo após a coleta, o material foi fixado em formol tamponado a 4% durante, no máximo, 48 horas.

Histologia:

Após fixação, os tecidos foram processados e incluídos em parafina. Os cortes foram corados com a coloração de hematoxilina-eosina (HE) e analisados sob microscopia óptica, para escolha da área a ser corada para imunohistoquímica e classificação das biópsias de endométrio. A classificação do endométrio foi realizada de acordo com o proposto por Kenney & Doig (1986) modificado por Schoon (1992), sendo considerada a presença de fibrose e as alterações inflamatórias. O diagnóstico histopatológico de endometrose foi feito baseado na presença de fibrose de moderada a severa, com mais de dois ninhos glandulares por campo e mais do que duas camadas de fibrose, baseado na definição de Schoon (1995).

Imunohistoquímica:

A imunohistoquímica foi realizada com a técnica de peroxidase anti-peroxidase. Para tanto os cortes foram reidratados e colocados em uma cuba com solução tampão de tris-EDTA, para recuperação antigênica (retrieval), com o objetivo de recuperar as estruturas que poderiam ter sido danificadas com a fixação do tecido em formol. Esta cuba ficou imersa em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 96°C. Após esta etapa os cortes foram colocados em uma solução a 5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol por 30min. para inibição da peroxidase endógena. A seguir passaram por uma solução bloqueadora de antígenos inespecíficos por 10 min. (Histostain® - plus Kits). Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho anti-RLH humano (LHR-H-50- Santa Cruz Biothecnology, Inc.) diluído a 1:200 em solução tampão, por 1h em temperatura ambiente. Para controle negativo, os cortes foram incubados apenas na solução tampão, sem o anticorpo. A ligação do anticorpo com o RLH foi detectada através do complexo ABC (Santa Cruz Biothecnology, Inc.) e revelada com a aplicação do cromógeno tetra-hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Finalmente os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, clarificados em xilol e montados com Entelan®. Entre todas as etapas os cortes foram lavados com uma solução tampão de fosfato salino (PBS) com pH 7,0.

Análise Imunohistoquímica:

A reação imunohistoquímica foi avaliada sob dois aspectos, a intensidade e a proporção de células coradas. Apenas foi considerada a coloração citoplasmática nas células. O método de avaliação utilizado neste experimento foi o proposto por Detre et al. (1995), denominado “quickscore”. A proporção de células coradas positivamente no corte foi definida através da análise de dez campos, em aumento de 400x e dividida em escores de 1 a 6 (1 = 0-4%; 2 = 5-19%; 3 = 20-39%; 4 = 40-59%; 5 = 60-79%; 6 = 80-100%). A intensidade média, correspondendo à presença de coloração negativa (0), fraca (1), intermediária (2) e forte (3) foi avaliada e foi aplicado um índice multiplicativo (proporção de células coradas x intensidade de coloração). Somente foi considerada a coloração do citoplasma.

Análise Estatística:

Os dados foram analisados usando ANOVA, com significância estatística de 95% ($P < 0.05$). Como variável dependente foi utilizado o escore imunohistoquímico para epitélio e músculo do oviduto; miométrio, epitélio glandular e epitélio luminal do útero; epitélio e músculo da cérvice de éguas com e sem endometrose. A análise estatística do experimento foi conduzida usando GraphPad InStat 3.0.

Resultados:

De acordo com a avaliação macroscópica, 18 éguas se encontravam em diestro no momento da coleta. Destas, sete apresentaram endometrose no exame microscópico. Quinze éguas estavam no estro no momento da coleta, sendo que dez apresentaram endometrose. Os resultados dos achados imunohistoquímicos estão indicados nas tabelas 2 e 3. Não se observou diferença significativa para a expressão de RLH nos diferentes tecidos do trato reprodutivo extragonadal de éguas com e sem endometrose, mas foi possível observar uma grande irregularidade na coloração das células do epitélio glandular no interior de focos fibróticos. Em alguns focos as glândulas mostraram maior reatividade, em outros, reatividade moderada e em outros ainda, observaram-se focos sem reatividade (Fig.2).

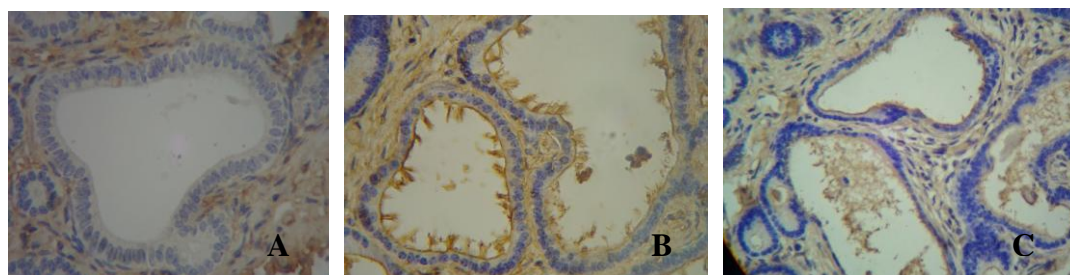


Fig.2. Expressão de RLH no citoplasma de células do epitélio glandular, dentro de foco fibrótico. A) epitélio glandular sem coloração (400x); B) epitélio glandular com coloração intensa (400x); C) epitélio glandular com coloração moderada em uma amostra com endometriose destrutiva (100x).

Tabela 2: Escore imunohistoquímico de receptores para LH no trato reprodutivo extragonadal de éguas em estro, com e sem endometriose.

Órgão/Tecido	Sem Endometriose (n=5)		Com Endometriose (n=10)	
	Escore (n ± dp)	Frequência (%)	Escore (n ± dp)	Frequência (%)
Oviduto				
Epitélio	6,0 ± 6,0	60	9,0 ± 5,8	80
Músculo	7,2 ± 5,0	80	3,0 ± 3,2	50
Útero				
Miométrio	7,2 ± 6,6	80	6,6 ± 4,4	80
Epitélio glandular	3,6 ± 5,4	40	3,0 ± 4,2	40
Epitélio luminal	9,6 ± 6,8	80	7,8 ± 4,0	90
Cérvice				
Epitélio	7,2 ± 5,0	80	9,6 ± 5,1	90
Músculo	6,0 ± 4,2	80	3,6 ± 3,1	60

Tabela 3: Escore imunohistoquímico de RLH no trato reprodutivo extragonadal de éguas em diestro com e sem endometriose.

Órgão/Tecido	Sem Endometriose (n=11)		Com Endometriose (n=7)	
	Escore (n ± dp)	Frequência (%)	Escore (n ± dp)	Frequência (%)
Oviduto				
Epitélio	7,6 ± 5,4	73	7,7 ± 4,5	86
Músculo	7,6 ± 4,7	82	6,8 ± 5,4	71
Útero				
Miométrio	5,5 ± 4,2	73	6,8 ± 2,3	100
Epitélio glandular	6,3 ± 5,7	73	4,3 ± 4,5	57
Epitélio luminal	9,8 ± 5,5	82	7,1 ± 6,4	71
Cérvice				
Epitélio	9,8 ± 5,5	82	8,6 ± 5,8	86
Músculo	7,1 ± 5,2	82	5,1 ± 4,1	71

Discussão:

No presente trabalho não foi verificada diferença significativa na expressão de RLH entre os diferentes tecidos do trato reprodutivo da égua, independente da endometrose e da fase do ciclo estral, porém houve variação acentuada de imunorreatividade entre as amostras de um mesmo grupo. Provavelmente este resultado seja reflexo da variação entre o dia do ciclo em que os animais se encontravam, já que os animais eram de abatedouro, sem histórico reprodutivo. A irregularidade de expressão de RLH nas células glandulares do endométrio, dentro dos focos fibróticos, em relação às áreas não atingidas por fibrose sugere uma independência destes focos em relação ao mecanismo de controle hormonal do útero. Estas diferenças também foram observadas por Aupperle et al. (2000) e Hoffmann et al. (2009a) em relação à expressão de hormônios esteróides ovarianos. Hoffmann et al. (2009b) constataram também, diferenças na secreção glandular dentro de focos fibróticos, concluindo que estas se devem a alterações no estímulo parácrino das glândulas pelas células do estroma fibrótico adjacente. Os autores concluíram que embora ocorra desvio de secreção dentro do foco, esta alteração influi pouco no padrão de secreção protéica e de carboidratos do endométrio, portanto apenas os casos de endometrose severa levam a desvios detectáveis através da eletroforese, na secreção uterina. Entretanto, a interação entre o útero e o conceito em desenvolvimento reage a pequenas alterações que podem agora ser mostradas pela imunohistoquímica.

O endométrio é um tecido complexo, que sofre inúmeras modificações fisiológicas durante o ciclo estral. Pequenas alterações na quantidade ou distribuição de receptores hormonais podem alterar todo o funcionamento do trato reprodutor, já que os hormônios são responsáveis por inúmeras funções do aparelho reprodutivo. Por outro lado sabe-se que o endométrio é apenas um dos tecidos que compõe o trato reprodutivo da égua. Provavelmente a facilidade de obter amostras deste tecido, juntamente com a boa correlação observada entre as alterações endometriais e a performance reprodutiva da égua, tenha restringido o foco dos estudos histopatológicos para este tecido, diferente do que ocorre em outras espécies. As diferenças observadas na expressão de RLH dentro dos focos fibróticos podem indicar um desvio funcional em relação a este hormônio em todo o trato reprodutivo da égua. A realização de novos estudos em animais com histórico reprodutivo conhecido pode vir a acrescentar mais informações sobre as alterações causadas pela endometrose na expressão de RLH no trato reprodutivo da égua, bem como as possíveis consequências desta alteração.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo financiamento deste estudo.

3.3. Artigo 3 – será enviado para publicação

Identificação Imunohistoquímica de Receptores para Estrógeno e Progesterona no Trato Reprodutivo Extra-gonadal da Égua

Anamaria Telles Esmeraldino^{1,3}, Eduardo Malschitzky¹, Sandra Fiala², Luisiane Santarém¹, Caroline Wolff³, Maria Inês Jobim³, Ricardo Gregory³, Rodrigo C. Mattos^{3,4}

1 - Curso de Medicina Veterinária, ULBRA, Canoas, Brasil

2 - Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – UFPEL, Pelotas, Brasil

3 - REPROLAB/ Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

4 - Pesquisador do CNPq

Resumo

Foi realizado um estudo imunohistoquímico em cortes parafinados, para se obter mais informações sobre a relação entre a fase do ciclo e as mudanças na expressão de receptores para hormônios esteróides, bem como as alterações relacionadas com a função nos vários tipos de células do trato reprodutivo extragonadal da égua. Também foram feitas comparações entre a reatividade em éguas com e sem endometrose. A intensidade e a proporção de células coradas para receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) nos diferentes tecidos do oviduto, útero e cérvix, foram avaliadas de forma semiquantitativa. Os dados foram estatisticamente comparados para o estro, diestro e anestro de inverno. No útero houve diferença significativa entre a reatividade para RP no estroma, que foi maior durante o ciclo estral do que no anestro. Entre os tecidos do útero observou-se que o epitélio luminal mostrou maior reatividade para RP do que o epitélio glandular, no estro. Durante o diestro o epitélio glandular também teve baixa reatividade para RP, sendo significativamente menor do que os outros tecidos. No anestro de inverno o epitélio luminal teve maior reatividade para RP do que estroma. Não houve diferença significativa de reatividade para RE entre os tecidos ou entre as fases do ciclo e o anestro, no entanto os valores médios não refletem a variação observada nas amostras individualmente. Provavelmente isto se deva aos diferentes dias do ciclo em que as amostras foram coletadas, já que se tratava de animais de abatedouro. Na cérvix, a diferença observada entre as fases foi no estroma, que apresentou maior reatividade para RE no anestro do que no diestro. Esta forte reatividade para RE durante o anestro pode indicar que os receptores marcados estejam desocupados. Entre os tecidos da cérvix, o epitélio luminal mostrou maior reatividade para os dois receptores durante o estro, do que os outros tecidos. No diestro o epitélio luminal teve maior reatividade para RE do que o estroma. No oviduto não foi observada diferença entre as fases. Durante o estro, a camada muscular apresentou maior reatividade para RE do que os outros tecidos. Durante o diestro, o epitélio luminal mostrou maior reatividade para RP do que o estroma. Este tecido também apresentou menor reatividade para RE do que a camada muscular. No epitélio luminal, observou-se ainda, uma nítida diferença na intensidade da coloração para os dois receptores. Aparentemente há maior reatividade nas células basais do que nas células ciliadas, refletindo uma diferença de função entre elas. Nas áreas com fibrose do endométrio de éguas com endometrose houve irregularidade na coloração para RE e RP, indicando má diferenciação funcional nos focos fibróticos. A variação na expressão de receptores esteróides nos tecidos

que compõe um mesmo órgão do trato reprodutivo, provavelmente refletem uma regulação autócrina e parácrina destes hormônios nas alterações cíclicas, funcionais e morfológicas, nestes tipos celulares.

Palavras-chave: trato reprodutivo; imunohistoquímica; égua, receptores para hormônios esteróides, ciclo estral, anestro.

Immunohistochemical Identification of Estrogen and Progesterone Receptors in Extragonadal Reproductive Tract of Mare

Abstract

To obtain more insight into the relationship between cyclic changes in steroid receptor expression and function-related changes in the various types of cell of the reproductive tract of mare, were performed an immunohistochemical study on paraffin-embedded sections. The intensity and the proportion of immunostaining cells for the oestrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) in the different tissues of oviduct, uterus and cervix were semi-quantitatively scored. The data were statistically compared for estrus, diestrus and winter anestrus. In uterus, the stroma showed strongest reactivity for during cycle than anestrus. The surface epithelial cells of endometrium showed strongest staining for PR than glandular epithelium during estrus. During diestrus, glandular epithelium showed lowest reactivity for PR than the others tissues. In the winter anestrus, the luminal epithelial cells showed strongest staining for PR than stromal cells. There was neither significant difference for ER reaction between tissues nor for stages of cycle and anestrus, however the mean values do not reflect the individual strains variation. Probably this is because the samples was collected in different days of cycle. In the cervix, the difference observed between the phases was in the stromal cells that showed strongest reactivity for ER in anestrus than in the diestrus. This strongest reactivity in the anestrus could indicate that the reactive receptors are unoccupied. The epithelial surface cells of cervix showed strongest reactivity for two receptors, than other tissues, during estrus and in the diestrus, these cells showed strongest reactivity for ER then stroma cells. In the oviduct there was no difference between the phases. During the estrus, the muscular cells showed more reactivity for ER than the other tissues and during the diestrus, epithelial surface cells showed strongest reactivity than stromal cells. This tissue also showed lowest reactivity for ER than muscular cells. The oviduct epithelial cells showed color variation for the receptors between ciliary and basal cells, probably reflecting the cells different function. In the mares with endometrosis, areas of endometrial fibrosis showed uneven coloration for ER and PR, indicating functional maldifferentiation of the fibrotic foci. A different expression of steroids receptors in tissues of the same organ and especially, the strongest staining of stromal than glandular epithelial cells, in the endometrium, probably reflects the autocrine-paracrine regulation of these hormones in cyclic, functional and morphologic changes in these tissues.

Keywords: reproductive tract; immunohistochemistry; estral cycle; anestrus; mare; steroid hormone receptors.

1. Introdução:

O estrógeno e a progesterona coordenam muitos eventos reprodutivos, incluindo complexas modificações físicas e comportamentais associadas com a cópula, a gestação, o parto e a lactação (ING et al., 1993). O papel dos hormônios esteróides ovarianos, bem como a expressão de receptores para estes hormônios no endométrio da égua, relacionados com as fases do ciclo estral e com a classificação através de biópsia endometrial, tem sido relatado por alguns autores (WATSON et al., 1992; AUPPERLE et al., 2000, 2003; SCHOON, 1999), que observaram uma maior concentração de receptores para estrógeno e progesterona durante o estro e diestro recente, diminuindo no diestro tardio. No entanto foi observada uma grande variação na imunorreatividade dependendo do tecido analisado.

Lehmann et al. (2011), compararam, através da imunohistoquímica, a expressão de receptores para estrógeno (RE) e receptores para progesterona (RP) e as características de expressão de proteínas no endométrio de éguas com variados graus de endometrose. As éguas foram divididas em vazias e prenhes, sendo que em ambos os grupos, o endométrio apresentou assincronia na expressão de RE e RP, nas áreas de fibrose periglandular, indicando que estas áreas podem apresentar um mecanismo de controle distinto das outras regiões do endométrio.

Embora a presença de receptores para hormônios esteróides tenha sido detectada no oviduto, útero e cérvix da mulher (PRESS et al., 1986; SNIDJERS et al., 1992; SHAH et al., 1999; ABUZEID et al., 1987), de ratas (PELLETIER et al., 2000; WANG et al., 2000; OKADA et al., 2003) e de bovinos (VESANEN et al., 1991; ULBRICH et al., 2003), na égua as pesquisas destes receptores tem se restringido ao útero, principalmente ao endométrio. Re et al. (1995) relataram a presença de RE e RP no útero e na cérvix de éguas, mas a metodologia utilizada não evidenciou a localização dos mesmos.

O oviduto dos mamíferos tem papel fundamental na reprodução. As células epiteliais criam um ambiente único, que permite o transporte e maturação dos gametas, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (AGUILAR, 2005; DESANTIS, 2010). Em estudo realizado com oviduto bovino, utilizando três diferentes técnicas para a expressão e localização de RE e RP, Ulbrich et al.(2003) demonstraram uma grande variabilidade na expressão proteica de RP e RE durante o ciclo estral. De modo geral as células do epitélio luminal apresentaram maior reatividade para RE próximo ao cio e para RP no diestro recente. A presença de maior reatividade para RP no músculo durante o início do diestro sugere, segundo os autores, uma ação da progesterona na motilidade do oviduto.

As funções contrastantes da cérvix, dependendo da fase do ciclo, e a sua função durante a gestação e o parto requerem numerosas modificações bioquímicas e morfológicas, que provavelmente são controladas por hormônios circulantes e moléculas teciduais. Embora existam muito menos estudos sobre a cérvix em relação às tubas uterinas e ao útero, os fatores regulatórios parecem ser os mesmos para os três órgãos (LIN et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição de RE e RP nos diferentes tecidos que compõe o oviduto, útero e cérvix da égua, através da imunohistoquímica. Objetivou-se também comparar a imunorreatividade destes receptores nas diferentes fases do ciclo estral e com diferentes graus de degeneração endometrial.

Materiais e Métodos:

Animais:

Foram coletadas amostras de útero, cérvix e oviduto, de 41 éguas sem raça definida e com histórico reprodutivo desconhecido, em um abatedouro localizado no sul do Brasil. As amostras foram classificadas macroscopicamente, de acordo com a fase do ciclo estral em que os animais se encontravam no momento do abate. Para tanto foram observados o tamanho dos folículos ovarianos, a presença de corpo lúteo e a conformação do endométrio. As éguas foram consideradas em estro quando havia um folículo dominante (> 35mm.) e edema endometrial evidente, foram classificadas em diestro quando havia um corpo lúteo evidente ou corpo hemorrágico nos ovários, pela identificação de um colo uterino contraído e sem hiperemia e pela presença de edema pouco pronunciado. Foram consideradas em anestro, as éguas que apresentaram folículos menores que 20mm e ausência de corpo lúteo. As amostras de endométrio e miométrio foram retiradas em um mesmo corte do corpo uterino, próximo ao corno esquerdo. As amostras da cérvix foram retiradas de sua porção junto ao útero (endocérvix) e as amostras de tuba uterina foram coletadas de diferentes segmentos. Logo após a coleta, o material foi fixado em formol tamponado a 4% por até 48 horas.

Histologia:

Após fixação, os tecidos foram processados, incluídos em parafina e cortados em micrótomo, a uma espessura de 4µm. Os cortes foram corados pela coloração de hematoxilina-eosina e analisados sob microscopia óptica, para escolha da área para imunohistoquímica e classificação do endométrio. A classificação foi realizada de acordo com o proposto por Kenney & Doig (1986) modificado por Schoon (1992), sendo considerada a

presença de fibrose e as alterações inflamatórias. No endométrio de éguas em anestro não foi realizada a classificação, pois nesta fase os resultados são imprecisos (GROSS et al., 1984)

Imunohistoquímica:

A imunohistoquímica foi realizada com a técnica de peroxidase anti-peroxidase. Para tanto os cortes colocados em lâminas previamente tratadas com Histogrip®, uma substância que mantém os cortes aderidos durante o processamento. Os cortes foram reidratados e colocados em uma cuba com solução tampão de tris-EDTA, para recuperação antigênica (“retrieval”), com o objetivo de recuperar as estruturas que poderiam ter sido danificadas com a fixação do tecido em formol. Esta cuba ficou imersa em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 96°C. Após esta etapa os cortes foram colocados em uma solução a 5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol por 30min., para inibição da peroxidase endógena. A seguir passaram por uma solução bloqueadora de antígenos inespecíficos por 10 min. (Histostain® - plus). Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-RE e anti-RP humano (Invitrogen®) por 1h em temperatura ambiente. Para controle negativo, os cortes foram encubados apenas na solução tampão, sem o anticorpo. Após, os cortes foram encubados com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, Invitrogen®) e terciário (Histostain® - plus). Os receptores presentes no tecido foram revelados com a aplicação do cromógeno tetra-hidroclorato de 3,3'- diaminobenzidina (DAB). Finalmente os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, clarificados em xilol e montados com Entelan®. Entre todas as etapas, os cortes foram lavados com uma solução tampão de fosfato salino (PBS) com pH 7,0.

Análise Imunohistoquímica:

A reação imunohistoquímica foi avaliada sob dois aspectos, a intensidade e a proporção de células coradas. Apenas foi considerada a coloração nuclear nas células. O método de avaliação utilizado neste experimento foi o proposto por Detre et al. (1995), denominado “quickscore”. A proporção de células coradas positivamente no corte foi definida através da análise de dez campos, em aumento de 400x e dividida em escores de 1 a 6 (1 = 0-4%; 2 = 5-19%; 3 = 20-39%; 4 = 40-59%; 5 = 60-79%; 6 = 80-100%). A intensidade média, correspondendo à presença de coloração negativa (0), fraca (1), intermediária (2) e forte (3) foi avaliada e foi aplicado um índice multiplicativo (proporção de células coradas x intensidade de coloração).

Análise Estatística:

Os dados foram analisados usando ANOVA, com significância estatística de 95% ($P < 0.05$). Como variável dependente foi utilizado o escore imunohistoquímico para epitélio e músculo do oviduto; miométrio, epitélio glandular e epitélio luminal do útero; epitélio e músculo da cérvix. A análise estatística do experimento foi conduzida usando GraphPad InStat 3.0.

Resultados:

Das 41 éguas, 15 estavam no estro, 18 em diestro e oito éguas em anestro. O exame microscópico do endométrio confirmou o diagnóstico macroscópico das diferentes fases do ciclo estral. Dez éguas no estro e sete éguas no diestro apresentaram endometrose.

A intensidade e a distribuição da coloração para os receptores de estrógeno e progesterona variaram de acordo com o tipo de célula. Todas as colorações com imunoperoxidase para RE e RP, só foram consideradas quando localizadas no núcleo celular em todos os tecidos examinados.

Conforme o observado na tabela 4, as células do estroma endometrial apresentaram maior reatividade para RP no ciclo estral do que no anestro. Quanto aos tecidos do útero, observou-se que o epitélio luminal apresentou maior imunorreatividade para RP do que o epitélio glandular, no estro. Durante o diestro o epitélio glandular mostrou reatividade mais baixa para RP do que os outros tecidos. No período de anestro, o epitélio luminal mostrou maior reatividade para RP do que o estroma. A imunorreatividade para RE não mostrou diferença significativa entre os tecidos nem entre as fases, no entanto houve uma grande variação individual para os dois receptores.

Tabela 4. Média e desvio padrão da imunorreatividade no exame imunohistoquímico do útero, dos receptores para estrogênio e progesterona no epitélio luminal, epitélio glandular, estroma e miométrio.

	Estro		Diestro		Anestro		P=
	RP	RE	RP	RE	RP	RE	
Músculo	15 ± 2,8	13,7 ± 3,7	14,8 ^c ± 4,1	12,6 ± 4,4	11,5 ± 5,3	11 ± 5,0	0,1
Epitélio luminal	15,9 ^c ± 3,9	14,3 ± 5,4	14,8 ^c ± 5,0	13,4 ± 5,4	16,2 ^c ± 3,3	16,2 ± 3,3	0,67
Glândula	11,5 ^d ± 4,1	11,9 ± 5,6	11,5 ^d ± 4,9	12,3 ± 3,7	12,1 ± 4,2	14,5 ± 4,0	0,94
Estroma	14,3 ^a ± 3,2	11,3 ± 4,8	14,4 ^a ± 3,3	11,6 ± 4,9	9,1 ^{b,d} ± 6,6	12,1 ± 6,5	0,01
p=	0,01	0,3	0,05	0,68	0,05	0,15	

Escore de imunorreatividade: 0=negativo, 6=fraco, 12=moderado, 18=forte.

Letras a, b diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para RP (P<0,05).

Letras c, d diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tecidos (P<0,05).

Neste experimento, embora não tenha havido diferença significativa entre os endométrios com e sem endometrose, as áreas afetadas mostraram coloração irregular para RE e RP (fig. 3). Em algumas áreas a coloração foi mais forte e em outras, mais fraca em relação às áreas normais.

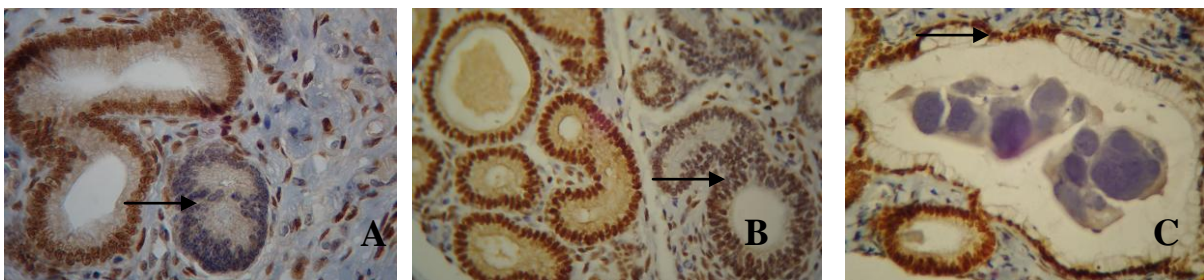


Figura 3. Expressão variável de RE (A) e RP (B,C), no núcleo células do epitélio glandular e estroma com fibrose. A: glândula com fibrose, sem coloração (flecha); B: glândulas com fibrose, sem coloração (flecha); C: glândula cística em foco fibroso com forte coloração (flecha).

Na cérvix, o estroma mostrou maior imunorreatividade para RE no anestro do que no diestro. Durante o estro, o epitélio luminal mostrou maior reatividade para os dois receptores, do que os outros tecidos. No diestro o epitélio luminal teve maior reatividade para RE do que o estroma (tabela 5). Como pode ser observado nas figuras 4 a 7, todos os tecidos apresentaram reatividade para os dois receptores, durante as três fases.

Tabela 5: Média e desvio padrão da imunorreatividade no exame imunohistoquímico da cérvix, dos receptores para estrogênio e progesterona no epitélio luminal, estroma e camada muscular.

	Estro		Diestro		Anestro		P=
	RP	RE	RP	RE	RP	RE	
Músculo	15,1 ± 4,0	13,5 ± 4,5	12,8 ± 5,2	12,3 ± 6,4	15,4 ± 3,0	16,9 ± 2,2	0,1
Epitélio luminal	16,2 ± 4,1	14,9 ± 4,5	15,4 ± 3,7	13,4 ± 3,8	15,8 ± 2,7	16,5 ± 2,8	0,67
Estroma	11,6 ± 6,9	9,9 ± 7,1	12,0 ± 5,2	8,7 ^a ± 5,5	14,9 ± 3,5	13,9 ^b ± 3,9	0,01
P=	0,05	0,05	0,08	0,04	0,85	0,12	

Escore de imunorreatividade: 0=negativo, 6=fraco, 12=moderado, 18=forte.

Letras a, b diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

Letras c, d diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tecidos (P<0,05).

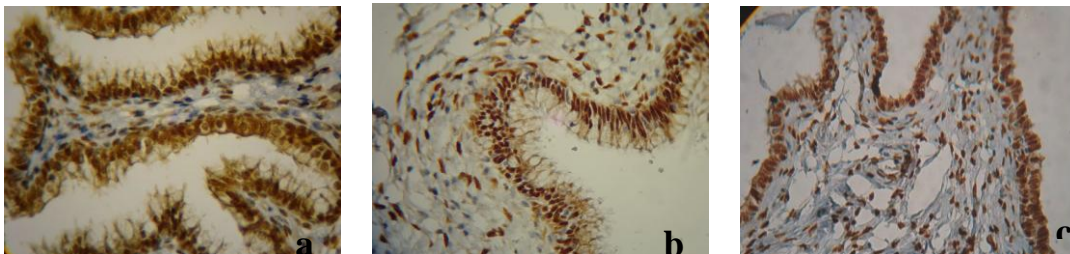


Figura 4: Fotomicrografias da expressão de RE na cérvix: a) estro; b) diestro; c) anestro

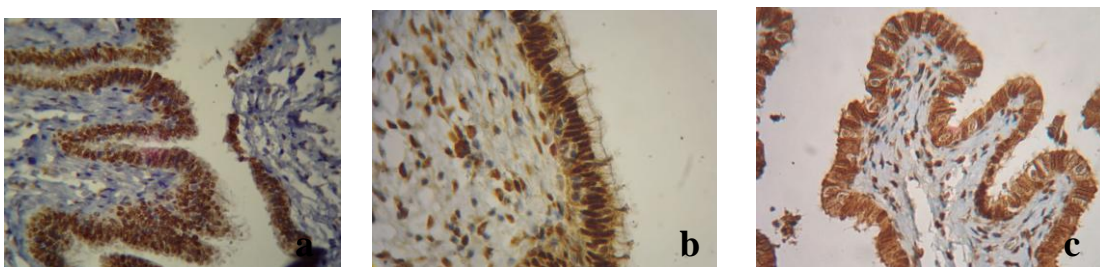


Figura 5. Fotomicrografias da expressão de RP na cérvix: a) estro; b) diestro c) anestro

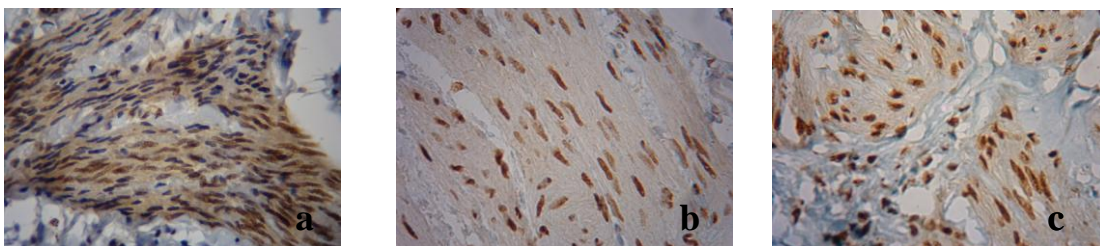


Figura 6. Fotomicrografias da expressão de RE no músculo da cérvix: a) estro; b) diestro; c) anestro

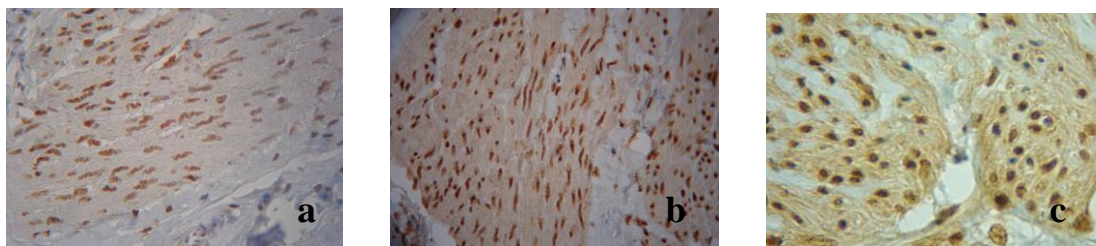


Figura 7. Fotomicrografias da expressão de RP no músculo da cérvix: a) estro; b) diestro c) anestro

No oviduto observou-se imunorreatividade de moderada a alta para RE e RP no epitélio luminal, no estroma e no músculo durante o estro, o diestro e também durante o anestro de inverno (figs. 8 a 11; tabela 3). Na camada muscular a reação para RE foi maior do que nos outros tecidos durante o estro. Durante o diestro as células do epitélio luminal mostraram maior reatividade do que o estroma. Já o estroma mostrou menor reatividade para RE do que as células musculares. A coloração das células epiteliais do oviduto foi nitidamente irregular, com o núcleo muito corado no que parecem ser células secretoras e pouco corado ou sem coloração nas células ciliadas (figs. 8 e 9).

Tabela 6: Média e desvio padrão da imunorreatividade no exame imunohistoquímico do oviduto, dos receptores para estrógeno e progesterona no epitélio luminal, estroma e camada muscular.

	Estro		Diestro		Anestro		P=
	RP	RE	RP	RE	RP	RE	
Músculo	14,7 ± 2,6	17,3 ^a ± 2,6	14,6 ± 2,6	16 ^a ± 3,1	13,2 ± 1,9	16,9 ± 2,2	0,177
Epitélio luminal	15,4 ± 3,1	14,9 ^b ± 2,7	16,2 ^a ± 3,8	13,1 ± 4,4	14,6 ± 3,4	14 ± 2,5	0,126
Estroma	14,7 ± 3,3	14,8 ^b ± 3,1	12 ^b ± 4,3	12,2 ^b ± 4,8	13,1 ± 4,4	16,3 ± 2,4	0,06
p=	0,78	0,02	0,006	0,02	0,62	0,06	

Escore de imunorreatividade: 0=negativo, 6=fraco, 12=moderado, 18=forte

Letras a, b diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

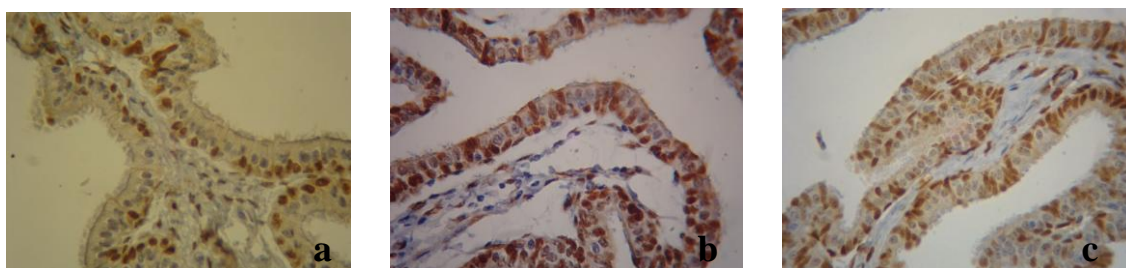


Figura 8. Fotomicrografias da expressão de RE no oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro

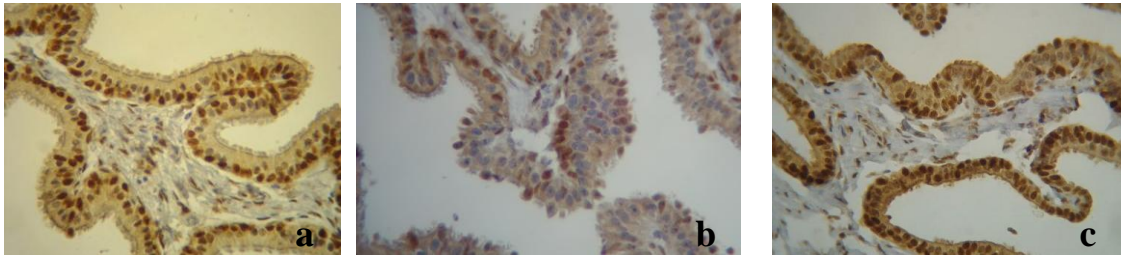


Figura 9. Fotomicrografias da expressão de RE no oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro

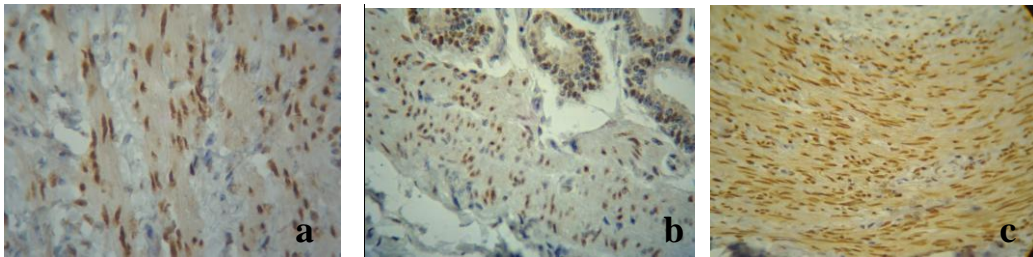


Figura 10. Fotomicrografias da expressão de RE no músculo do oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro

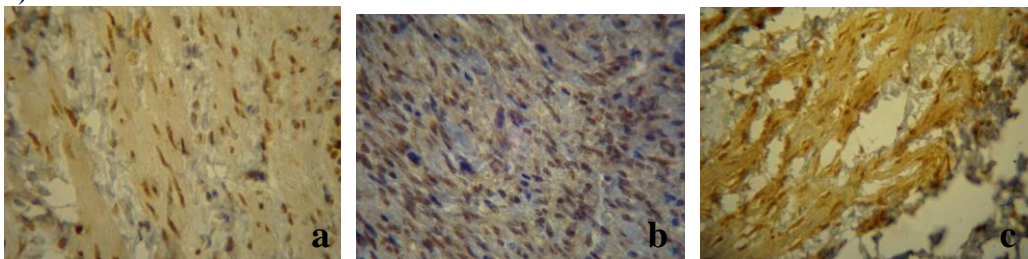


Figura 11. Fotomicrografias da expressão de RP no músculo do oviduto: a) estro; b) diestro; c) anestro

Discussão:

Foi investigada a localização e a imunorreatividade de RE e RP nos diferentes tecidos do trato reprodutivo da égua. A localização dos receptores foi apenas nuclear. O mesmo foi observado por Aupperle et al. (2000) e Watson et al. (1992).

O epitélio luminal do endométrio mostrou imunorreatividade de moderada a alta para RE e RP nas duas fases do ciclo e no anestro. Watson et al. (1992) encontrou uma reação fraca para RE e moderada para RP no epitélio luminal durante as duas fases do ciclo. Já Aupperle et al. (2000), observou reação fraca para RE e RP no epitélio luminal durante todo o ciclo.

Neste experimento, o epitélio glandular apresentou imunorreatividade moderada nas duas fases do ciclo e no anestro para os dois receptores. Durante o estro, este tecido mostrou escore mais baixo para os dois receptores do que os outros tecidos do útero. No diestro, o epitélio glandular apresentou o escore mais baixo para RP. Tanto o estroma endometrial

quanto o miométrio, durante as duas fases do ciclo, mostraram reatividade moderada a alta para RE e RP, no entanto o índice de reatividade foi maior para RP nos dois tecidos e nas duas fases.

No epitélio glandular, Aupperle et al. (2000) identificaram maior reatividade para RE no início do diestro, com valores baixos no diestro tardio. Já Hartt et al. (2005), usando outras técnicas além da imunohistoquímica, observaram uma maior intensidade para RE e RP no período peri-ovulatório, com declínio no diestro tardio, em todos os tipos celulares do endométrio equino. Re et al. (1995) e McDowell et al. (1999) não observaram diferença na concentração de RE nas duas fases do ciclo, no endométrio da égua, embora estes autores não tenham utilizado a imunohistoquímica, o que impossibilitou a localização dos receptores.

Aupperle et al. (2000) encontraram reatividade baixa para RE nas células do estroma, durante todo o diestro, aumentando gradualmente no estro e mostrando reatividade máxima no dia da ovulação. Já a reatividade para RP nas células do estroma, segundo os autores, foi praticamente inexistente no início do diestro, atingindo o máximo no diestro tardio. Watson et al. (1992) observaram reatividade de moderada a alta para RE e RP no estroma, durante o estro, com reatividade fraca no diestro. No miométrio a reação para RE foi de fraca a moderada no estro e quase inexistente no diestro. Para RP, a reatividade no miométrio foi fraca em todas as fases.

Em outras espécies, como bovinos (MEIKLE et al., 2001; BOOS et al., 1996), suínos (SUKJUMLONG et al., 2003), ovinos (WATHES & HAMON, 1993), humanos (PRESS et al., 1986 e 1988) e primatas não humanos (SLAYDEN & BRENNER, 2004), também foi observada variação na expressão e localização de RE e RP de acordo com as fases do ciclo e com o tipo celular. De modo geral acredita-se que a ação do estrógeno durante o estro seja estimulatória para a presença de RE e RP e que no diestro, com aumento da progesterona, ocorra inibição destes receptores. Além disso, a variação de expressão de acordo com o tipo tecidual provavelmente seja devida às diferentes funções destas células. A complexidade encontrada na formação e perda desses receptores, segundo Wathes & Hamon (1993) sugere que eles sejam regulados não só pela concentração de esteróides circulantes como também por fatores parácrinos locais.

As amostras de útero coletadas de éguas em anestro de inverno apresentaram reatividade forte no epitélio luminal, tanto para RE quanto para RP em quase todas as amostras, semelhante aos resultados observados nas éguas cíclicas. No epitélio glandular foi observada reatividade moderada; no miométrio a reatividade foi moderada para os dois receptores, com valores médios semelhantes aos encontrados nas éguas em diestro. No

estroma, a reatividade mostrou-se baixa para RE e moderada para RP. Aupperle et al. (2000) e McDowell et al. (1999) também observaram presença de reatividade variável para RE e RP no endométrio de éguas em anestro fisiológico. O mesmo foi observado por Jäger et al., (2008) em mulas acíclicas. No útero de mulheres após a menopausa, Press et al. (1988) observou forte reatividade para RP no epitélio glandular da metade das amostras. Nos outros tecidos a reatividade foi menor do que no útero de mulheres em idade reprodutiva. A presença de receptores para RP e RE no útero acíclico reflete a coloração de receptores ocupados e desocupados, bem como a complexidade dos mecanismos envolvidos na presença desses receptores.

Embora não tenha havido diferença significativa entre os endométrios com e sem endometrose, as áreas afetadas mostraram coloração irregular para RE e RP. Em alguns ninhos foi observada uma reatividade intensa em relação às áreas normais e em outros a reatividade foi mais fraca do que a média. Esta irregularidade também foi observada por Aupperle et al. (2000). Nas áreas de endométrio com má diferenciação também se observou alteração na coloração. Schoon et al. (2000) observaram que glândulas com má diferenciação têm alta expressão de RE e baixa expressão de RP, entretanto dentro de uma mesma glândula pode haver grande irregularidade de coloração.

Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas de imunorreatividade para RE e RP entre as fases do ciclo, provavelmente porque não foi possível determinar o dia do ciclo em que as amostras foram coletadas, já que se tratava de animais de abatedouro, sem histórico reprodutivo. Outra diferença desse experimento em relação aos dados encontrados por Aupperle et al. (2000) e por Watson et al. (1992) foi a imunorreatividade alta para RE e RP no epitélio luminal, nas duas fases do ciclo. Esta diferença pode estar relacionada com o número de amostras, os anticorpos utilizados e até mesmo com as diferenças na época da colheita. Hartt et al. (2005) também encontraram reatividade alta para RE e RP no epitélio luminal, com decréscimo apenas no diestro tardio.

A cérvix apresentou imunorreatividade moderada a alta para RE e RP no epitélio luminal e no músculo nas três fases examinadas. No estroma observou-se escore mais baixo para RE e RP durante o estro, e para RE durante o diestro. Snidjers et al. (1992), observaram intensa reação no epitélio da cérvix humana, para RE e RP, durante todas as fases do ciclo menstrual. Na cérvix de mulheres na menopausa, a reatividade foi intensa para RE e moderada para RP. No estroma e no músculo, a reação foi moderada e constante durante o ciclo e também após a menopausa, de forma semelhante ao observado nesse trabalho. Press et al. (1986) observaram pouca variação na imunorreatividade para RE, durante o ciclo

menstrual, no epitélio e estroma da cérvix de mulheres, com reatividade alta nestes tecidos, com exceção da fase secretora tardia, em que a reatividade no estroma foi moderada. Na cérvix de mulheres após a menopausa, os resultados foram semelhantes aos da fase reprodutiva, levando os autores a concluir que tanto os receptores ocupados quanto os não ocupados encontram-se corados. Wang et al. (2000), utilizando outra técnica, observaram um aumento de RNAm de RE nas células do estroma e do epitélio da cérvix de ratas, durante o diestro, com uma variação maior nas células do epitélio luminal do que no estroma.

Quanto às variações de reatividade entre os tecidos da cérvix e do útero, no presente trabalho não foi observada diferença significativa entre estas duas porções do trato genital. Re et al. (1995), encontraram uma concentração menor de RE e RP na cérvix do que no útero, mas a técnica utilizada foi de extração dos receptores, sem localização dos diferentes tecidos. Vesanen et al. (1991) também encontraram uma concentração menor desses receptores na cérvix do que no útero de vacas, mas a diferença não foi significativa. Os autores relacionaram a presença de receptores na cérvix às alterações de conformação durante as diferentes fases do ciclo. Em um estudo realizado por Schmitz et al. (2006), os autores constataram que a reposição de estradiol em ovelhas ovariectomizadas diminuiu a expressão de receptores para PGE no estroma da cérvix, o que poderia representar um mecanismo secundário de dilatação da cérvix pelo estrógeno.

Este estudo demonstrou a presença de receptores para estrógeno e progesterona no epitélio luminal, no estroma e na camada muscular do oviduto de éguas, durante o estro, o diestro e o anestro de inverno. No epitélio, os valores encontrados foram de moderados a altos, sem variação significativa nas três fases. Diferente do epitélio luminal dos outros órgãos, a coloração das células epiteliais do oviduto foi nitidamente irregular, com o núcleo muito corado no que parecem ser células secretoras e pouco corado ou sem coloração nas células ciliadas, refletindo provavelmente as diferentes funções das células epiteliais neste órgão. Esta característica também foi observada por Press et al. (1986) na tuba uterina da mulher, por Ulbrich et al. (2003) no oviduto bovino e por Pelletier et al. (2000), Wang et al. (2000) e Okada et al. (2003) no oviduto de ratas. Okada et al. (2003) confirmaram que as células não coradas eram ciliadas através de imunomarcagem destas células com β tubulina IV, um marcador de células epiteliais ciliadas. Valle et al. (2006), diferente dos outros autores, observaram reatividade para RE e RP nas células ciliadas e não ciliadas do epitélio do oviduto de vacas.

No estroma a reatividade foi moderada durante a fase luteal, mostrando reatividade um pouco mais alta durante o estro e o anestro. No epitélio luminal a reatividade para RP foi

maior do que nos outros tecidos durante o diestro. Na camada muscular do oviduto observou-se intensa reatividade para RE nas três fases, sendo significativamente maior do que os outros tecidos do órgão para RE durante o estro e diestro. Press et al. (1986) também observaram reatividade um pouco maior para RE na tuba uterina da mulher, durante a fase proliferativa, embora todos os tecidos tenham mostrado reatividade alta nas diferentes fases do ciclo e após a menopausa. Pelletier et al. (2000) e Wang et al. (2000) observaram reação intensa nos três tecidos durante todas as fases do ciclo, enquanto Okada et al. (2003) relataram reatividade levemente mais alta no diestro recente.

Estas discordâncias provavelmente são consequência da variabilidade das espécies estudadas, da época das coletas, dia do ciclo em que ocorreram as coletas e diferenças de anticorpos utilizados.

Através da técnica de imunohistoquímica, foi possível detectar a presença de receptores para estrógeno e progesterona nos diferentes tecidos do trato reprodutivo extragonadal da égua. Embora existam nesta espécie inúmeros estudos sobre as alterações histológicas que ocorrem no endométrio de acordo com as diferentes fases do ciclo estral e também dos processos patológicos que atingem a mucosa uterina, ainda há poucos estudos sobre o reflexo destas alterações na performance reprodutiva. As variações observadas na presença de receptores hormonais no endométrio e em outros tecidos do trato reprodutivo da égua, podem ajudar a desvendar os problemas reprodutivos em éguas aparentemente saudáveis.

A despeito da existência de inúmeras pesquisas sobre a expressão de receptores para hormônios esteróides nos tecidos do trato reprodutivo da fêmea em diferentes espécies, a expressão, localização e função destes receptores no oviduto permanecem pouco conhecidas. Na espécie equina, não há relatos sobre a presença destes receptores no oviduto.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Através da técnica de imunohistoquímica, foi possível detectar a presença de receptores para estrógeno, progesterona e hormônio luteinizante nos diferentes tecidos do trato reprodutivo extragonadal da égua. Embora existam nesta espécie inúmeros estudos sobre as alterações histológicas que ocorrem no endométrio de acordo com as diferentes fases do ciclo estral e também dos processos patológicos que atingem a mucosa uterina, ainda há poucos estudos relacionando estas alterações morfológicas com as alterações funcionais do trato reprodutivo. Apesar da existência de inúmeras pesquisas sobre a expressão de receptores para hormônios esteróides e para hormônio luteinizante nos tecidos do trato reprodutivo da fêmea em diferentes espécies, a expressão, localização e função destes receptores no trato reprodutivo da égua permanecem pouco conhecidas.

Neste estudo podemos observar uma grande variação na imunorreatividade entre as amostras de um mesmo tecido. Também foram observadas diferenças entre os diferentes tecidos da cérvice, oviduto e do útero, sugerindo uma regulação autócrina e parácrina destes hormônios. No entanto, o escore de imunorreatividade para os receptores hormonais variou pouco entre as fases do ciclo e mesmo no anestro de inverno, o que contrasta com outros relatos. Estas discordâncias provavelmente são consequência da época em que ocorreram as coletas, das diferenças de anticorpos utilizados e principalmente, das variações entre os dias do ciclo em que as amostras foram coletadas, já que se tratava de animais de abatedouro. A diferença entre as espécies também pode interferir nas comparações, já que existem poucos estudos sobre a presença de receptores hormonais no trato reprodutivo da égua, com exceção de RE e RP no endométrio. Nos animais com endometrose, foi possível verificar a alteração na expressão dos três receptores estudados, no epitélio glandular dentro de focos fibróticos, sugerindo uma independência do foco fibrótico em relação ao tecido sadio, o que pode diminuir a capacidade reprodutiva da égua.

A possibilidade da pesquisa de diversos tipos protéicos presentes no trato reprodutivo através da imunohistoquímica, em especial o estudo de receptores hormonais, pode proporcionar um melhor entendimento sobre a fisiologia e fisiopatologia da reprodução na égua.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUZEID,M.I.; WIEBE,R.H.; AKSEL,S.; SHEPHERD,J.; YEOMAN,R.R. Evidence for a possible cytosol estrogen receptor deficiency in endocervical glands of infertile women with poor cervical mucus. **Fertil Steril**, v.47, p.101-107, 1987.

AGUILAR,J.; REYLEY,M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. **Anim Reprod**, v.2, p.91-105, 2005.

ALLEN,W.R. Luteal deficiency and embryonic mortality in the mare. **Reprod Dom Animal**, v36, p.121-131, 2001.

ALLEN,W.R.; SHORT,R.V. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. **J Hered**, v.88, p.384-392, 1997.

ALM, Y.H.; SUKJUMLONG, S.; KINDAHL, H.; DALIN, A.M. Steroid hormone receptors ERalpha and PR characterized by immunohistochemistry in the mare adrenal gland. **Acta Vet Scand**, v.22, p.51-31, 2009.

AUPPERLE,H.. Immunohistologische Untersuchungen am Endometrium der Stute. Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Dissertation, 1997.

AUPPERLE,H.; STEIGER,K.; REISCHAUER,A.; SCHOON,H-A. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the physiological and pathological inactivity of the equine endometrium. **Pferdeheilkunde**, v.19, p.629-632, 2003.

AUPPERLE,H.; ÖZGEN,S.; SCHOON,H-A.; SCHOON,D.; HOPPEN,H-O.; SIEME,H; TANNAPFEL,A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensive in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.228-232, 2000.

BACHA JUNIOR,W.J.; BACHA,L.M.. **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. 2ª ed., São Paulo, SP, BR : Editora Roca; 2000.

BALL,B.A. Embryonic death in mares. In : MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, USA: Lea & Febinger, p.225-233, 1993.

BANKS, W.J. Female Reproductive System. In: _____. **Applied Veterinary Histology**. 3.ed. Missouri, USA: Mosby Year Book, p.446-468, 1993.

BIANCHI,C.P.; MEIKLE,A.; SARTORE,I.; GONZÁLEZ,F.; ABA,M.A. Uterine estrogen receptor alpha and progesterone receptor during the follicular and luteal phase in llamas. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.117-126, 2007.

BLITEK,A.; ZIECIK,A.J. Effect of LH on prostaglandin $F_{2\alpha}$ and prostaglandin E_2 secretion by cultured porcine endometrial cells. **Reproduction**, v.130, p.105-112, 2005.

BRASILEIRO FILHO,G.; REIS,L.F.L.; BARBOSA,A.J.A.; MIRANDA,D. Métodos de estudo em Patologia. In: Brasileiro Filho,G. **Bogliolo Patologia Geral**. 7.ed. Rio de Janeiro, RJ, BR, p.6-20, 2006.

BOOS,A.; MEYER,W.; SCHWARTZ,R.; GRUNERT,E. Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.44, p.11-21, 1996.

CHERNY, R.A.; SALAMONSEN, L.A.; FINDLAY, J.K.. Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v.3, p.321-331, 1991.

CHUDGAR,D.; LEI,Z.; RAO,C.V. Orthotopic transplantation of LH receptor knockout and wild-type ovaries. **Life Sciences**, v.77, p.2656-2662, 2005.

COOKE,P.S.; BUCHANAN,D.L.; LUBAHN,D.B.; CUNHA,G.R. Mechanism of Estrogen Action: Lessons from the Estrogen Receptor- α Knockout Mouse. **Biology of Reproduction**, v.59, p.470-475, 1998.

COPPENS,M.T.; BOEVER,J.G.; DHONT,M.A.; SERREYN,R.F.; VANDEKERCKHOVE,D.A.; ROELS,H.J. Topographical distribution of estrogen and progesterone receptors in the human endometrium and Fallopian tube. **Histochemistry and Cell Biology**, v.99, p.127-131, 1993.

COUTIFARIS,C. Histological dating of secretory endometrium: what controversy? **Fertility and Sterility**, v.82, p.1301-1302, 2004.

DAELS,P.F.; HUGUES,J.P. The normal estrous cycle. In: MCKINNON,A.O.; VOSS,J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, USA: Lea & Febinger, p-121-132, 1993.

DERECKA,K.; PIETILÄ,E.M.; RAJANIEMI,H.J.; ZIECIK,A.J. Cycle dependent LH/hCG receptor gene expression in porcine nongonadal reproductive tissues. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.46, p.77-85, 1995.

DESANTIS,S.; ZIZZA,S.; ACCOGLI,G.; ACONE,F.; ROSSI,R. RESTA,L. Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. **Theriogenology**, p.1-8, 2010.

DETRE,S.; JOTTIS,S.; DOWNSETT,M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **J Clin Pathol**, v.48, p.876-878, 1995.

DOIG,P.A.; WAELCHLI,R.O. Endometrial biopsy. In: MCKINNON,A.O.; VOSS,J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, USA: Lea & Febinger, p-225-233, 1993.

DUFAU,M.L. The luteinizing hormone receptor. **Annu Rev Physiol**, v.60, p.461-496, 1998.

ELLENBERGER,C.; BARTMANN,C.P.; KLUG,E.; HOPPEN,H-O.; HOFFMANN,C.; BAZER,F.W.; KLUG,J.; ALLEN,W.R.; SCHOON,D.; SCHOON,H-A. Immunohistochemical characterization of equine endometrial maldifferentiation with special emphasis on uterine secretory proteins. **Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer 4th-6th**, Rio de Janeiro, RJ, BR, p.13-15, 2004.

ELLENBERGER,C.; WILSHER,S.; ALLEN,W.R.; HOFFMANN,C.; KÖLLING,M.; BAZER,F.W.; KLUG,J.; SCHOON,D.; SCHOON,A.-A. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare’s uterus and placenta throughout pregnancy. **Theriogenology**, v.70, p.746-757, 2008.

ELLINGTON,J.; SAMPER,J.C. Oviductal Epithelial Cells: Can they select the better sperm? **Advanced Current Topics in Stallion Veterinary Practice**, p.17-20, 2000.

ESMERALDINO, A.T.; MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.M.; SANTAREM, L.; WOLF, C.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C. Immunohistochemical identification of Luteinizing Hormone Receptors in the Extra-gonadal Reproductive Tract of the Mare. **Anim. Reprod. Sci.** v.1215, p.538-539, 2010.

EVANS,T.J.; MILLER,M.A.; GRANJAM,V.K.; NISWENDER,K.D.; ELLERSIECK,M.R.; KRAUSE,W.J.; YOUNGQUIST,R.S. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **Am J Vet Res**, v.59, p.1209-1214, 1998.

FLOOD,P.F. The Development of the Conceptus and Its Relationship to the Uterus. **Reproduction in domestic animals**. 4.ed. San Diego, USA: Academic press, p.315-356, 1987.

FLOWERS,B.; ZIECIK,A.J.; CARUOLO,E.V. Effects of human chorionic gonadotrophin on contractile activity of steroid-primed pig myometrium in vitro. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.92, p.425-432, 1991.

FIELDS,M.J.; SHEMESH,M. Extragonadal Luteinizing Hormone Receptors in the Reproductive Tract of Domestic Animals. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1412-1418, 2004.

FILICORI,M.; FAZLEABAS,A.T.; HUHTANIEMI,I.; LICHT,P.; RAO,C.V.; TESARIK,J.; ZYGMUNT,M. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. **Fertility and Sterility**, v.84, p.275-284, 2005.

FREIDMAN,S.; GUREVICH,M.; SHEMESH,M. Bovine Cyclic Endometrium Contains High-Affinity Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Binding Sites. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1020-1026, 1995.

GARCIA,J.E. Endometrial biopsy: a test whose time has come. **Fertility and Sterility**, v.82, p.1293-1294, 2004.

GAWRONSKA,B.; STEPIEN,A.; ZIECIK,A.J. Effect of estradiol and progesterone on oviductal LH-receptors and LH-dependent relaxation of the porcine oviduct. **Theriogenology**, v.53, p.659-672, 2000.

GAWRONSKA,B.; PAUKKU,T.; HUHTANIEMI,I.; WASOWICZ,G.; ZIECIK,A.J. Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig Fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.293-301, 1999.

GERMANÀ,A.; CASSATA,R.; CRISTARELLA,S.; SCIRPO,A.; MUGLIA,U. Three-Dimensional Architecture of the Myosalpinx in the Mare as Revealed by Scanning Electron Microscopy. **The Anatomical Record**, v.267, p.235-241, 2002.

GINTHER,O.J. **Reproductive Biology of the mare, Basic and Applied Aspects**. 2.ed. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1992.

GINTHER,O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses (Boock 2)**. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1995.

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

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

GROSS,T.L.; LEBLANC,M.M. Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. **J.Am.Vet.Med.Assoc.**, v.184, p.1379-1382, 1984.

GRÜNINGER,B.; SCHOON,H.A.; SCHOON,D.; MENGER,S.; KLUG,E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. **J Comp Pathol**, v.119, p.293-309, 1998.

HAFEZ,E.S.E. Hormônios, Fatores de crescimento e Reprodução. In:_____. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo, SP, BR: Manole, p.258-266, 1995.

HAN,S.W.; LEI,Z.M.; RAO,CH.V. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin in mucosal cells from human fallopian tubes. **Endocrinology**, v.137, p.2929-2937, 1996.

HANEY,A.F. Endometrial biopsy: a test whose time has come and gone. **Fertility and Sterility**, v.82, p.1295-1296, 2004.

HARTT,L.S.; CARLING,S.J.; JOYSE,M.M.; JOHNSON,G.A.; VANDERWALL,D.K.; OTT,T.L. Temporal and spatial associations of estrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction Research**, v.130, p.241-250, 2005.

HENDRICKSON,M.R.; ATKINS,K.A.; KEMPSON,R.L. Uterus and Fallopian Tubes. In: MILLS,S.E. **Histology for Pathologists**, 3.ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincot Williams & Wilkins, p.1011-1062, 2007.

HENRICKS, D.M. Biochemistry and Physiology of the Gonadal Hormones. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**, 4.ed. San Diego, USA: Academic press, p.80-113,1987.

HOFFMANN,C.; BAZER,F.W.; KLUG,J.; AUPPERLE,H.; ELLENBERGER,C.; SCHOON,H-A. Morpho-funcional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secrections-preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v.19, n.6, p.666-669, 2003.

HOFFMANN,C.; ELLENBERGER,C.; MATTOS,R.C.; AUPPERLE,H.; DHEIN,S.; STIEF,B.; SCHOON,H-A. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.261-278, 2009a.

HOFFMANN,C.; BAZER,F.W.; KLUG,J.; AUPPERLE,H.; ELLENBERGER,C.; SCHOON,A.-A. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for mares suffering from endometrosis. **Theriogenology**, v.71, p.264-274, 2009b.

HOMEIDA,A.M.; AL-EKNAH,M.M.; ALTHNAIAN,T.A.; AL-HAIDER,A.K.; AL-BOKHADAIM,I.F.; AL-MUBARAK,A.I. Effects of Reproductive Status, Ovariectomy and Sex Steroid Aministration on Estrogen and Progesterone Receptors in the Uterus of Camel. **Research Journal of Pharmacology**, v.4, p.5-8, 2010.

HUNTER,R.H.F.; FLÉCHON,B.; FLÉCHON,J.E. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: A scanning electron microscope study. **Tissue and Cell**, v.23, p.641-656, 1991.

ING,N.H.; TORNESI,M.B. Estradiol Up-Regulates Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression in Specific Ovine Uterine Cells. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1205-1215, 1997.

JÄGER,K.; ELLENBERGER,C.; BARTMANN,C.P.; RASS,J.; BAZER,F.W.; KLUG,J.; ALLEN,W.R.; HOPPEN,H-O; HOFFMANN,C.; SCHOON,H-A. Histopathological and immunohistochemical findings during the sexual cycle in female mules and effects of long-term Regumate® administration. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.44-52, 2008.

KAINER, R.A. Reproductive organs of the mare. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Philadelphia, USA: Lea & Febinger, 1993, p.5-18.

KENNEY,R.M. Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **JAVMA**, v.172, p.241-262, 1978.

KENNEY,R.M. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: Hughes,J.P. Workshop on Equine Endometritis. Newmarket, UK. **Equine Vet J.**, v.25, p.186, 1992.

KENNEY,R.M.; DOIG,P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW,D.A. **Current Therapy in Theriogenology 2**, p..723-729, 1986.

KELLER,A.; NEVES,A.P.; AUPPERLE,H.; STEIGER,K.; SCHOON,H-A.; KLUG,E.; GREGORY,R.M.; MATTOS,R.C. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratos: aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.215-223, 2004.

KUMAR,T.R. What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? **Reproduction**, v.130, p.293-302, 2005.

LAPOLT,P.S.; JIA,X.C.; SINCICH,C.; HSUEH,A.J. Ligand-induced down-regulation of testicular and ovarian luteinizing hormone (LH) receptors is preceded by tissue-specific inhibition of alternatively processed LH receptor transcripts. **Mol Endocrinol**, v.5, p.397-403, 1991.

LECCE,G.; MEDURI,G.; ANCELINA,M.; BERGERON,C.; PERROT-APPLANAT,M. Presence of Estrogen Receptor β in the Human Endometrium through the Cycle: Expression in Glandular, Stromal, and Vascular Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.1379-1386, 2001.

LEFEBVRE,R.; SAMPER,J.C. A study of the interaction between stallion spermatozoa and oviductal epithelial cells in vitro. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.39-41, 1993.

LEHMANN,J.; ELLENBERGER,C.; HOFFMANN,C.; BAZER,F.W.; KLUG,J.; ALLEN,W.R.; SIEME,H.; SCHOON,H-A. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. **Theriogenology**, v.76, p.1326-1336, 2011.

LEI,Z.M.; TOTH,P.; RAO,CH.V.; PRIDHAM,D. Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes. **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, p.863-872, 1993.

LEITH, G.S.; GINTHER, O.J. Mobility of the conceptus and uterine contradictions in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.701-711, 1985.

LIN,P.C.; LI,X.; LEI,Z.M.; RAO,C.V. Human Cervix Contains Functional Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p.3409-3414, 2003.

MALSCHITZKY,E.; FIALA,S.M.E.; ESMERALDINO,A.T.; NEVES,A.P.; GARBADE,P.; JOBIM,M.I.M., GREGORY,R.M.; MATTOS,R.C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.74-78, 2008.

MEIKLE,A.; SAHLIN,L.; FERRARIS,A.; MASIRONI,B.; BLANC,J.E.; RODRÍGUEZ-IRAZOQUI,M.; RODRÍGUEZ-PIÑÓN,M.; KINDAHL,H.; FORSBERG,M. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor α , progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.45-56, 2001.

MCDONALD,L.E. Reproductive Patterns of Horses. In: MCDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4.ed. Philadelphia, USA: Lea & Febinger, p.348-352, 1989.

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

MCKINNON,A.O.; VOSS,J.L. **Equine Reproduction**. 6.ed. Blackwell Publishing. 2005.

MIRAGAYA,M.H.; WOODS,G.L.; LOSINNO,L. Endometritis, salpingitis and fertilisation rates after mating mares with a history of intrauterine luminal fluid accumulation. **Equine Vet J**, v.25, p.109-112, 1997.

MISHRA,S.; LEI,Z.M.; RAO,C.V. A Novel Role of Luteinizing Hormone in the Embryo Development in Cocultures. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1455-1462, 2003.

MOTTA,P.M.; NOTTOLA,S.A.; FAMILIARI,G. MACCHIARELLI,G.; CORRER,S.; MAKABE,S. Structure and function of the human oocyte-cumulus-corona cell complex before and after ovulation. **Protoplasma**, v.206, p.270-277, 1999.

MUGNIER,S.; KERVELLA,M.; DOUET,C.; CANEPA,S.; PASCAL,G.; DELEUZE,S.; DUCHAMP,G.; MONGET,P.; GOUDET,G. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? **Reprod Biol Endocrinol**, v.7, p.129, 2009.

MURRAY,M.K. Morphological Features of Epithelial Cells in the Sheep Isthmus Oviduct During Early Pregnancy. **The Anatomical Record**, v.247, p.368-378, 1997.

MYLONAS,I.; JESCHKE,U.; SHABANI,N.; KUHN,C.; BAILE,A.; KRIEGEL,S.; MARKUS,M.S.; KUPKA,S.; FRIESE,K. Immunohistochemical analysis of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in normal human endometrium. **Acta Histochemica**, v.106, p.245-252, 2004.

MYLONAS,I.; MAKOVITZKY,J.; FRIESE,K.; JESCHKE,U. Immunohistochemical labelling of steroid receptors in normal and malignant human endometrium. **Acta Histochemica**, v.111, p.350-360, 2009.

NEELY,D.P. Endocrinología reproductiva y fertilidad en la yegua. In: NEELY,D.P.; LIU,I.K.M.; HILLMAN,R.B. **Reproducción equina**. Montevideo, UY: Hemisferio Sur, p.1-20, 1989.

NISWENDER,G.D. Mechanisms of hormone action. In: MCKINNON,A.O.; VOSS,J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febinger, p-27-36, 1993.

ODDSDÓTTILIR C.; RILEY S.C.; LEASK R.; EDUARDES D.R.; WATSON E.D. Activities of matrix metalloproteinases-9 and -2 in uterine fluid during induced equine endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.24,p.70-73, 2008.

OKADA,A.; OHTA,Y.; INOUE,S.; HIROI,H.; MURAMATSU,M.; IGUCHI,T. Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.30, p.301-315, 2003.

OZGEN,S.; RASCH,K.; KROPP,G.; SCHOON,H-A; AUPPERLE,H.; SIEME,H.; KLUG.E. Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromucometra: Preliminary Data. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.533-536, 1997.

PAKARAINEN,T.; AHTIAINEN,P.; ZHANG,F-P.; RULLI,S.; POUTANEN,M.; HUHTANIEMI,I. Extragonadal LH/hCG action – Not yet time to rewrite textbooks. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.269, p.9-16, 2007.

PAKARAINEN,T.; ZHANG,F-P.; POUTANEN,M.; HUHTANIEMI,I. Fertility in luteinizing hormone receptor-knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, p.1862-1868, 2005.

PELLETIER,G.; LABRIE,C.; LABRIE,F. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. **Journal of Endocrinology**, v.165, p.359-370, 2000.

PINEDA, M. H. Female Reproductive System. In: MCDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4.ed. Philadelphia, USA: Lea & Febinger, p.303-354, 1989.

PRESS,M.F.; NOUSEK-GOEBL,N.; KING;W.J.; HERBST,A.L.; GREENE,G.L. Immunohistochemical assessment of estrogen receptor distribution in the human endometrium throughout the menstrual cycle. **Lab Invest Nov.**, v.51, p.495-503, 1984.

PRESS,M.F.; NOUSEK-GOEBL,N.A.; BUR,M.; GREENE,G.L. Estrogen Receptor Localization in the Female Genital Tract. **American Journal of Pathology**, v.123, p.280-292, 1986.

PRESS,M.F.; UDOVE,J.A.; GREENE,G.L. Progesterone Receptor Distribution in the Human Endometrium: Analysis Using Monoclonal Antibodies to the Human Progesterone Receptor. **American Journal of Pathology**, v.131, p.112-124, 1988.

PRIEDKALNS,J. Female Reproductive System. In: DELLMANN,H-D. **Textbook of Veterinary Histology**. 4 ed. Philadelphia, USA: Lea&Febinger, p.233-251, 1993.

PTASZYNSKA,M. **Compendium of animal reproduction**, 7.ed. Intervet, 2001.

RAO,C.V.; LEI,Z.M. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.269, p.2-8, 2007.

RAMOS,J.A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**. v.42, p.405-426, 2005.

RAHMAN,N.A.; RAO,C.V. Recent progress in luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin hormone research. **Molecular Human Reproduction**, v.15, p.703-711, 2009.

RE,G.; BADINO,P.; NOVELLI,A.; DI RENZO,G.F.; SEVERINO,L.; DE LIGUORO,M; FERONE,M.R. Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. **Veterinary Science**, v.59, p.214-218, 1995.

RESHEF,E.; LEI,Z.M.; RAO,C.V.; PRIDHAM,D.D.; CHEGINI,N.; LUBORSKY,J.L. The Presence of Gonadotropin Receptors in Nonpregnant Human Uterus, Human Placenta, Fetal Membranes, and Decidua. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.70, p.421-430, 1990.

RICKETTS,S.W.; ALONSO,S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. **Equine Veterinary Journal**, v.23, p.185-188, 1991.

RICKETTS,S.W.; ALONSO,S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, v.23, p.189-192, 1991.

ROBINSON,R.S.; MANN,G.E.; LAMMING,G.E.; WATHES,D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v.122, p.965-979, 2001.

ROSER,J.F.; EVANS,J.W. Luteal Luteinizing Hormone Receptors During the Postovulatory Period in the Mare. **Biology of Reproduction**, v.29, p.499-510, 1983.

RZUCIDLO,S.J.; WEIGL,R.M.; TILTON,J.E. Myometrial LH/hCG receptors during the estrous cycle and pregnancy in pigs. **Animal Reproduction Science**, v.51, p.249-257, 1998.

SCHEERBOOM,J.E.M.; VAN ADRICHEM,P.W.M.; TAVERNE,M.A.M. Uterine motility of the sow during the oestrous eyed and early pregnancy. **Vet Res Commun**, v.11, p.253-269, 1987.

SCHLAFER,D.H. Equine endometrial biopsy: Enhancement of cliical value by more extensive histopatology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v.68, p.413-422, 2007.

SCHMITZ,T.; LEVINE,B.A.; NATHANIELSZ,P.W. Localization and steroid regulation of prostaglandin E₂ receptor protein expression in ovine cervix. **Reproduction**, v.131, p.743-750, 2006.

SCHOON,H-A.; SCHOON,D. The Category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? **Pferdeheilkunde**, v.19, p.698-701, 2003.

SCHOON,H-A.; SCHOON,D.; KÖTTER,B.; RUNGE,A.; KLUG,E. Zur Pathogenese und Prognose ser Endometrose der Stute. In: **Dtsch.Vet.Med.Ges. (Hrsg.): Bericht des 21. Kongresses der DVG**, Bad Nauheim, p.273-282, 1995.

SCHOON,H-A.; SCHOON,D.; KLUG,E. The endometrial biopsy in the mare with regard to clinical correlations. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.453-464, 1997.

SCHOON,H-A.; SCHOON,D.; KLUG,E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde**, v.8, p.355-362, 1992.

SCHOON,H-A.; SCHOON,D.; WIEGANDT,I.; BARTMANN,C.P.; AUPPERLE,H. "Endometrial maldifferentiation" – A clinically significant diagnosis in equine reproduction? **Pferdeheilkunde**, v.15, p.555-559, 1999.

SCHOON,H-A.; WIEGANDT,I.; SCHOON,D.; AUPPERLE,H.; BARTMANN,C.P. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: a histological and immunohistological study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.381-391, 2000.

SENGER,P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**, 2.ed., Pullman,WA, USA: Current Conceptions, Inc., p.10-43, 2003.

SENGUPTA,A.; SRIDARAN,R. Expression and Localization of Gonadotropin-releasing Hormone Receptor in the Rat Oviduct During Pregnancy. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.56, p.25-31, 2008.

SHAH,A.; NANDEDKAR,T.D.; RAGHAVAN,V.P.; PARULEKAR,S.V.; NATRAJ,U. Characterization and localization of estrogen and progesterone receptors of human fallopian tube. **Indian J Exp Biol**, v.37, p.893-899, 1999.

SHEMESH,M.; FIELDS,M.J. Extragonadal Luteinizing Hormone Receptors in the Reproductive Tract of Domestic Animals. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1412-1418, 2004.

SHEMESH,M.; MIZRACHI,D.; GUREVICH,M.; SHORE,L.S.; REED,J.; CHANG,S.M.; THATCHER,W.W.; FIELDS,M.J. Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium: LH augmentation of cAMP and inositol phosphate in vitro and human chorionic gonadotropin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin in vivo. **Reprod Biol**, v.1, p.13-32, 2001.

SHEMESH,M.; MIZRACHI,D.; GUREVICH,M.; STRAM,Y.; SHORE,L.S.; FIELDS,M.J. Functional Importance of Bovine Myometrial and Vascular LH Receptors and Cervical FSH Receptors. **Semin Reprod Med**, v.19, p.87-96, 2001.

SISSON, S. Aparelho Urogenital. In: _____. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro, RJ, BR: Guanabara, p.507-514, 1986.

SLAYDEN,D.; BRENNER,R.M. Hormonal regulation and localization of estrogen, progestin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists. **Arch Histol Cytol**, v.67, p.393-409, 2004.

SNIJDERS,M.P.M.L.; DE GOEIJ,A.F.P.M.; DEBETS-TE BAERTS,M.J.C.; ROUSCH,M.J.M.; KOUDSTAAL,J.; BOSMAN,F.T. Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle end after the menopause. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.363-371, 1992.

SPENCER,T.E.; WILEY,A.A.; BARTOL,F.F. Neonatal Age and Period of Estrogen Exposure Affect Porcine Uterine Growth, Morphogenesis, and Protein Synthesis. **Biology of Reproduction**, v.48, p.741-751, 1993.

STEFFL,M.; SCHWEIGER,M.; AMSELGRUBER,W.M. Immunophenotype of porcine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle: a double-labelling immunohistochemical study. **Histochem Cell Biol**, v.121, p.239-244, 2004.

STEPIEN,A.; DERECKA,K.; GAWRONSKA,B.; BODEK,G.; ZWIERZCHOWSKIL,L.; SHEMESH,M.; ZIECIK,A.J. LH/hCG Receptors in the porcine uterus – A new evidence of their presence in the cervix. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.51, p.917-931, 2000.

STEPIEN,A.; SHEMESH,M.; ZIECIK,A.J. Luteinising hormone receptor kinetic an LH-induced prostaglandin production throughout the oestrous cycle in porcine endometrium. **Reprod Nutr Dev**, v.39, p.663-674, 1999.

STEWART,F.; KENNEDY,M.W.; SUIRE,S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. **Cell Mol Life Sci**, v.57, p.1373-1377, 2000.

SUN,T.; LEI,Z.M., RAO,C.V. A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. **Molecular and Celular Endocrinology**, v.131, p.97-108, 1997.

SUKJUMLONG,S.; KAEOKET,K.; DALIN,A-M; PERSSON,E. Immunohistochemical Studies on Oestrogen Receptor Alpha (ER α) and the Proliferative Marker Ki-67 in the Sow Uterus at Different Stages of the Oestrous Cycle. **Reprod Dom Anim.**, v.38, p.5-12, 2003.

TAVERNE,M.A.M.; VAN DER WEYDEN,G.C.; FONTIJNE,P; DIELEMAN,S.J.; PASHEN,R.L.; ALLEN,W.R. In-vivo myometrial electrical activity in the cyclic mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.521-532, 1979.

THOMAS,P.G.A.; BALL,B.A. Cytofluorescent Assay to Quantify Adhesion of Equine Spermatozoa to Oviduct Epithelial Cell in Vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.55-61, 1996.

THOMAS,P.G.A.; BALL,B.A.; BRINSKO,S.P. Interaction of Equine Spermatozoa with Oviduct Epithelial Cell Explants Is Affected by Estrous Cycle and Anatomic Origin of Explant. **Biology of Reproduction**, v.51, p.222-228, 1994.

THOMAS,P.G.A.; IGNOTZ,G.G.; BALL,B.A.; BRINSKO,S.P.; CURRIE,W.B. Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cell. **Am J Vet Res** , v.56, p.1657-1662, 1995.

TOMANELLI,R.N.; SERTICH,P.L.; WATSON,E.D. Concentrations of oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare. **J Reprod Fertil Suppl**, v.44, p.267-273, 1991.

ULBRICH,S.E.; KETTLER,A.; EINSPANIER,R. Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.84, p.279-289, 2003.

VALLE,G.R.; CASSALI,G.D.; NOGUEIRA,J.C.; CASTRO,A.C.S.; REIS,A.M.; CARDOSO,F.M.; FIGUEIREDO,C.B.O.; NASCIMENTO,E.F. Nuclear estrogen and progesterone receptors in the oviduct of heifers under natural and superovulated estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.28-37, 2007.

VESANEN,M.; ISOMAA,V.; ALANKO,M.; VIHKO,R. Bovine uterine, cervical and ovarian estrogen and progesterone receptor concentrations. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.61-71, 1991.

WAELEHLI,R.O. Endometrial BIOPSY IN MARES UNDER NONUNIFORM BREEDING MANAGEMENT CONDITIONS: Prognostic value and relationship with age. **Can Vet J**, v.31, p.379-384, 1990.

WALTER,I.; HANDLER,J.; MILLER,I.; AURICH,C. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. **Histol Histopathol**, v.20, p.1105-1113, 2005.

WALTER,I.; HANDLER,J.; REIFINGER,M.; AURICH,C. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. **Reproduction**, v.121, p.581-586, 2001.

WANG,H.; ERIKSSON,H.; SAHLIN,L. Estrogen Receptors α and β in the Female Reproductive tract of the Rat During the Estrous Cycle. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1331-1340, 2000.

WANG,H.; MASIRONI,B.; ERIKSSON,H.; SAHLIN,L. A Comparative Study of Estrogen Receptors α and β in the Rat Uterus. **Biology of Reproduction**, v.61, p.955-964, 1999.

WATHES,D.C.; HAMON,M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. **Journal of Endocrinology**, v.138, p.479-491, 1993.

WATSON,E.D.; SKOLNIK,S.B.; ZANECOSKY,H.G. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. **Therogenology**, v.38, p.575-580, 1992.

XIAO,C.W.; GOFF,A.K.. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptor in cultured bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.101-109, 1999.

YAMASHITA,S.; KORACH,K.S. A modified immunohistochemical procedure for the detection of estrogen receptor in mouse tissues. **Histochemistry**, v.90,p.325-330, 1989.

YOU,S.; KIM,H.; HSU,C-C.; EL HALAWANI,M.E.; FOSTER,D.N. Three Different Turkey Luteinizing Hormone Receptor (tLH-R) Isoforms I: Characterization of Alternatively Spliced tLH-R Isoforms and Their Regulated Expression in Diverse Tissues. **Biology of Reproduction**, v.62, p.108-116, 2000.

ZHENG,M.; SHI,H.; SEGALOFF,D.L.; VAN VOORHIS,B.J. Expression and Localization of Luteinizing Hormone Receptor in the Female Mouse Reproductive Tract. **Biology of Reproduction**, v.64, p.179-187, 2001.

ZIECIK,A.J.; BODEK,G.; BLITEK,A.; KACZMAREK,M.; WACLAWIK,A. Nongonadal LH receptors, their involvement in female reproductive function and a new applicable approach. **The Veterinary Journal**, v.169, p.75-84, 2005.

ZIECIK,A.J.; DERECKA-RESZKA,K; RZUCIDLO,S.J. Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. **Journal Physiol Pharmacol**, v.43, p.33-49, 1992.

ZIECIK,A.J.; KACZMAREK,M.; BLITEK,A.; KOWALCZYK,A.E.; LI,X.; RAHMAN,N.A. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.269, p.51-60, 2007.

ZIECIK,A.J.; OSTROWSKA,G.; KISIELEWSKA,J.; ZEZULA-SZPYRA,A. Distribution and cycle phase dependency of gonadotropin receptors in musculature and blood vessels of the porcine broad ligament. **Exp Clin Endocrinol**, v.103, p.44-51,1995.

ZIECIK,A.J.; STANCHEV,P.D.; TILTON,J.E. Evidence for the presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-binding sites in the porcine uterus. **Endocrinology**, v.119, p.1159-1163,1986.

ZIECIK,A.J.; STEPIEN,A.; GAWRONSKA,B. Importance of Endometrial Luteinizing Hormone Receptors in Induction of Luteolysis and Maternal Recognition of Pregnancy in the Pig. **Reprod Dom Anim**, v.35, p.190-192, 2000.

ZIMMERMANN,G.; ACKERMANN,W.; ALEXANDER,H. Epithelial Human Chorionic Gonadotropin Is Expressed and Produced in Human Secretory Endometrium During the Normal Menstrual Cycle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.1053-1065, 2009.