

Ian Martin

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DO ÚTERO DE BOVINOS
DURANTE O CICLO ESTRAL**

Botucatu – SP

2003

Ian Martin

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DO ÚTERO DE BOVINOS
DURANTE O CICLO ESTRAL**

**Seminário apresentado à Disciplina de
Seminários I, do Programa de Pós-graduação
em Medicina Veterinária, nível Mestrado, Área
de Reprodução Animal, da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ /
UNESP – Campus de Botucatu**

Aluno: Ian Martin

Orientador: Prof. Ass. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Professores Responsáveis: Prof^a Dr^a Maria Denise Lopes

Prof Dr Sony Dimas Bicudo

Botucatu - SP

2003

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	04
1. Introdução.....	05
2. Funções do Útero.....	05
3. Endocrinologia.....	06
4. Avaliação Anatômica e Histológica.....	11
5. Ação Hormonal sobre o Útero.....	13
6. Imunoistoquímica.....	16
6.1. Fundamentos Imunológicos dos Métodos Imunoistoquímicos.....	17
6.2. Principais Técnicas de Imunoistoquímica.....	18
6.2.1. Técnicas de Imunoperoxidase (IPx).....	18
6.2.1.1. Método Direto.....	18
6.2.1.2. Método Indireto.....	18
6.2.1.3. Método do Ac Ponte.....	19
6.2.1.4. Método da Peroxidase - Antiperoxidase (PAP).....	19
6.2.1.5. Métodos que Utilizam a Interação Avidina - Biotina.....	19
6.2.1.5.1. Método da Avidina - Biotina.....	19
6.2.1.5.2. Método do Complexo Avidina - Biotina - Peroxidase (ABC).....	20
6.2.1.5.3. Método da Streptavidina - Biotina Marcada.....	20
6.2.1.5.4. Método do Polímero Marcado e Conjugado com Anticorpos Secundários.....	20
6.2.2. Técnicas de Fosfatase Alcalina (AP).....	21
6.2.2.1. Método da Fosfatase Alcalina - Antifosfatase Alcalina (APAAP).....	21
6.2.3. Técnicas que empregam outras Enzimas.....	21
6.2.4. Métodos Baseados no Emprego do Ouro Coloidal.....	21
6.2.4.1. Método da Prata - Imune - Ouro.....	21
6.3. Requerimentos das Técnicas de Imunoistoquímica.....	22
6.3.1. Preservação dos Antígenos.....	22
6.3.2. Manejo dos Anticorpos.....	22
6.4. Controles.....	23
6.5. Especificidade.....	23
6.6. Sensibilidade.....	23
6.7. Quantificação da Imunoistoquímica.....	23

6.8. Custo Aproximado de uma Reação.....	23
7. Considerações Finais.....	24
8. Referências.....	24

Lista de Abreviaturas

- GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotropinas
- LH = Hormônio Luteinizante
- FSH = Hormônio Folículo Estimulante
- PRF = Fator Liberador da Prolactina
- PIF = Fator Inibidor da Prolactina
- TRH = Hormônio Liberador de Tireotropina
- POMC = Proopiomelanocortina
- TSH = Hormônio Tireotrópico
- PRL = Prolactina
- ADH = Hormônio Anti-diurético
- OXT = Ocitocina
- CL = Corpo Lúteo
- P₄ = Progesterona
- E₂ = Estrógeno
- IHQ = Imunoistoquímica
- Ag = Antígeno
- Ac = Anticorpo
- Ag-Ac = Antígeno-Anticorpo
- Ipx = Imunoperoxidase
- Px = Peroxidase
- DAB = 3,3'-diaminobencidina
- PAP = Peroxidase-Antiperoxidase
- ABC = Complexo Avidina – Biotina – Peroxidase
- AP = Fosfatase Alcalina
- APAAP = Fosfatase Alcalina - Antifosfatase Alcalina

1. Introdução

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo específico de desenvolver técnicas e procedimentos que favoreçam uma maior eficiência reprodutiva em espécies animais de interesse zootécnico. Entre esses estudos, aqueles que envolvem a organização morfológica do sistema reprodutor feminino merecem atenção especial visto que as modificações histofisiológicas que ocorrem no sistema genital durante o ciclo estral agem diretamente sobre o organismo, influenciando o metabolismo e o comportamento da fêmea.

Os objetivos desta revisão foram caracterizar os aspectos endocrinológicos e histológicos do útero de bovinos durante o ciclo estral, pois, indubitavelmente, trata-se de um assunto de importância para o conhecimento da fisiologia desta espécie. Além disso, será descrita a técnica de imunoistoquímica, uma técnica empregada atualmente em estudos relacionados à fisiologia animal.

2. Funções do Útero

O útero realiza funções que são essenciais para a reprodução. Como principais podemos citar (BANKS, 1992; HAFEZ, 1995; GONZÁLEZ, 2002):

- Transporte e capacitação dos espermatozoides durante seu percurso até o oviduto preparando-os para a fertilização, mediante a contração do miométrio e as secreções uterinas;
- Controle da função luteal, mediante mecanismos luteolíticos causados pela prostaglandina $F_{2\alpha}$ produzido pelas células endometriais; esta é transportada pela veia uterina, passando por um trajeto veno-arterial que envolve a artéria ovárica, para o corpo lúteo ipsi-lateral onde provoca a regressão luteal;
- Favorecimento do desenvolvimento inicial do embrião, sua implantação e crescimento do feto durante a gestação
- Contrações uterinas durante o parto. Estas forçam o feto e suas membranas contra o cérvix, estimulando receptores sensoriais e, conseqüentemente o reflexo de liberação de ocitocina. Esta estimulará o miométrio previamente sensibilizado pelo estrógeno a contrair causando maior dilatação cervical e expulsão do feto (NOAKES, 1997).

3. Endocrinologia

O ciclo estral é definido como a seqüência de eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais que ocorrem entre dois estros sucessivos. O ciclo estral resulta da interação coordenada de 4 tecidos: sistema nervoso central, hipotálamo-hipófise, ovário e útero. A comunicação entre esses órgãos ocorre principalmente mediante 6 hormônios: hormônio liberador de gonadotropinas - GnRH (do hipotálamo), hormônio luteinizante - LH e hormônio folículo estimulante - FSH (da hipófise), estradiol - E₂ e progesterona - P₄ (do ovário) e prostaglandina (do útero) (GONZÁLEZ, 2002).

O eixo hipotálamo-hipófise é a unidade funcional de integração dos sistemas nervoso central e endócrino, que regula importantes funções metabólicas, tais como crescimento, lactação, reprodução e equilíbrio hídrico. Em resposta às mensagens do sistema nervoso central, o hipotálamo produz hormônios regulatórios que passam para a hipófise anterior, seu órgão-alvo primário. Depois de estimulada, a hipófise anterior secreta hormônios que vão via sanguínea para outro grupo de órgãos endócrinos (órgãos-alvo secundário), os quais incluem as gônadas. Estas, por sua vez, ao serem estimuladas pela hipófise, secretam hormônios que vão pelo sangue até seus respectivos órgãos-alvo finais (NOAKES, 1997; GONZÁLEZ, 2002).

Os hormônios hipotalâmicos relacionados com a reprodução incluem o GnRH, os fatores liberador (PRF) e inibidor (PIF) da prolactina e o hormônio liberador de tireotropina - TRH (GONZÁLEZ, 2002). Este mesmo autor relata dois tipos de secreção do GnRH, uma tônica e outra cíclica sendo que o controle da secreção é feita pela próprias gonadotropinas hipofisárias (LH e FSH) e pela progesterona e o estradiol.

A hipófise ou pituitária é uma estrutura altamente complexa formada por grupos celulares que sintetizam diferentes tipos de hormônios. É, ainda, dividida em três porções: adenohipófise ou hipófise anterior, neurohipófise ou hipófise posterior e lóbulo intermediário. Os hormônios da adenohipófise podem ser divididos em três grupos, de acordo com as células que o produzem: hormônios derivados da proopiomelanocortina (POMC) produzidos pelas células cromóforas; hormônios glicoprotéicos produzidos pelas células basófilas; e os hormônios promotores de crescimento e lactogênicos produzidos pelas células acidófilas. Apenas os hormônios de interesse na reprodução serão aqui abordados. Os

hormônios glicoprotéicos compreendem as gonadotropinas (FSH/LH) e a tireotrofina (hormônio tireotrópico – TSH). A secreção das gonadotropinas hipofisárias está sob controle do GnRH hipotalâmico, obedecendo a uma modulação (*feedback*) negativa por parte dos esteróides gonadais (estrógeno e progesterona). A secreção basal das gonadotropinas é pulsátil sendo interrompida por um pico massivo de LH durante o estro; esse pico de LH é disparado por um pico de GnRH hipotalâmico, o qual, por sua vez, é causado por uma aumento na liberação de 17 β -estradiol durante o proestro (*feedback* positivo). O FSH na fêmea é responsável pelo crescimento e a maturação de folículos ovários. O LH tem como função induzir a ovulação e manter o corpo lúteo, além de estimular, junto com o FSH, a secreção de esteróides. A prolactina - PRL ou hormônio lactogênico, produzida na adenohipófise, apresenta secreção pulsátil controlada inibitoriamente por ação da dopamina e estimulada pelas endorfinas, pois estas inibem a secreção de dopamina. A secreção de PRL também é favorecida por PRF, TRH, estrógenos, progesterona e por estímulos neurogênicos como a sucção do mamilo pelo lactente, a ordenha ou por sensações de calor, dor e estresse. É, ainda, possível uma auto-regulação por ação direta sobre o hipotálamo (*feedback* sobre o TRH). A PRL é secretada com flutuações durante os diferentes estados do ciclo reprodutivo. Aumentos de PRL ocorrem durante a ovulação, durante a fase luteal, e também durante a lactação e parto (NOAKES, 1997; GONZÁLEZ, 2002).

A neurohipófise possui terminações axônicas de neurônios hipotalâmicos que armazenam dois hormônios: o hormônio anti-diurético (ADH) e a ocitocina (OXT). Do ponto de vista reprodutivo o hormônio neurohipofisário de interesse é a ocitocina. A secreção da OXT é estimulada via neurogênica por amamentação, ordenha, parto, dilatação cervical ou vaginal ou estímulo clitoriano, sendo a acetilcolina o modulador estimulante e a adrenalina e a noradrenalina os agentes inibidores. Os níveis de OXT têm variações durante o ciclo ovário, a concentração sanguínea aumenta depois do pico pré-ovulatório de LH e diminui depois da regressão do corpo lúteo. Os estrógenos ovários estimulam a liberação de OXT pituitária enquanto que a progesterona a inibe. A OXT causa contração do miométrio durante o parto, e sua ação é dependente do estrógeno, pois este estimula a síntese de receptores para OXT (GONZÁLEZ, 2002).

O ovário apresenta duas funções, atua como órgão endócrino produzindo os esteróides sexuais, estrógeno e progesterona, bem como alguns hormônios protéicos, e também de forma cíclica os gametas femininos (McDONALD, 1989; GONZÁLEZ, 2002). O desenvolvimento dos ovários é dependente da secreção das gonadotropinas, que induzem a secreção de hormônios gonadais pelos ovários (McDONALD, 1989).

A produção de estrógeno no ovário bovino requer a interação entre a teca folicular e as células da granulosa. Os andrógenos são produzidos na teca e se difundem até as células da granulosa, onde são convertidos em estrógeno pela enzima aromatase. Os estrógenos apresentam a mais ampla extensão de funções fisiológicas de todos os hormônios esteróides, sendo necessários para as manifestações do estro (HAFEZ, 1995). Este mesmo autor relatou que o estrógeno e a progesterona agem sinergicamente em várias funções fisiológicas incluindo o crescimento de glândulas uterinas e mamárias. O período de estro é caracterizado por elevada secreção de estrógenos dos folículos pré-ovulatórios. Estes estimulam o crescimento uterino por um mecanismo que envolve a interação do hormônio com receptores e o aumento de processos sintéticos dentro das células. Outros efeitos do estrógeno em relação à reprodução incluem o controle da liberação de hormônios hipofisários, potencialização dos efeitos da ocitocina e prostaglandinas sobre as contrações uterinas e auxílio no processo de implantação.

Assim como o estrógeno, a progesterona é um hormônio esteróide sintetizado a partir do colesterol. A maior fonte de progesterona é o corpo lúteo, porém esta também já foi isolada do córtex da adrenal e placenta (McDONALD, 1989). Em animais da raça Nelore foi relatado que a concentração de progesterona aumenta continuamente do segundo dia após a ovulação até atingir seu platô por volta do oitavo dia, o qual é mantido até o dia quinze, em média, quando declinam para níveis basais, sugerindo que a luteólise ocorra por volta dos dias 15 a 18 após a ovulação (FIGUEIREDO et al., 1997). Sua função básica é preparar o endométrio para a implantação e manutenção da prenhez pelo aumento secretório do endométrio e inibição da motilidade miometrial. Em vacas, durante a fase lútea do ciclo estral e na gestação, a progesterona secretada pelo corpo lúteo produz um mecanismo retrógrado negativo na liberação do LH e, por este motivo, não ocorre ovulação (FORTUNE, 1994; HAFEZ, 1995). Segundo

Fernandes (1994) e Wiltbank et al. (1995) existe uma correlação positiva entre a massa de tecido luteal e a produção de progesterona.

Os bovinos são animais poliéstricos não sazonais, nos quais o estro ocorre em intervalos de 20 dias para novilhas e 21 dias para vacas (McDONALD, 1989; NOAKES, 1997; NOAKES, 2001), com uma variação normal de 18 -22 dias e 18-24 dias respectivamente (NOAKES, 2001). O proestro dura cerca de dois dias, e o estro de 14 a 18 horas em vacas taurinas (McDONALD, 1989) e ao redor de 11 horas em zebuínas (BARROS et al., 1992). O metaestro tem duração de aproximadamente três dias. O corpo lúteo se mantém funcional até por volta do dia 17 do ciclo e a ovulação ocorre de 12 a 16 horas após o final do estro (MCDONALD, 1989). Grunert (1982) e Moraes (2003) também dividiram o ciclo estral em 4 fases, com as seguintes durações, respectivamente, proestro, 3 e 3 a 4 dias, estro 18 e 12 a 18 horas, metaestro 2 a 3 e 3 a 5 dias e diestro 14 e 10 a 12 dias.

O ciclo estral pode, então, ser dividido em proestro, estro, metaestro e diestro. As fases de proestro e estro são também chamadas de fases estrogênicas ou proliferativas; e as fases de metaestro e diestro de fases progesterônicas ou secretoras. A fase de proestro é a fase que precede imediatamente o estro, e se inicia quando a concentração de progesterona está baixa e ocorre um rápido crescimento folicular estimulado pelo FSH e LH que determinam aumento do estrógeno. Nesta fase ocorrem comportamentos que demonstram uma aproximação do estro, com um aumento marcado na atividade dos sistema reprodutor. O estro ocorre quando a fêmea sob forte estimulação estrogênica aceita a monta pelo macho ou outra fêmea, o estrógeno apresenta-se com um padrão pulsátil e relacionado com o LH, semelhante ao proestro. Em torno de 4 a 6 horas do início do cio ocorre uma onda pré-ovulatória de LH com duração média de 8 horas e cerca de 26 ± 7 horas antes da ovulação. Esta onda é caracterizada por um aumento tanto na amplitude quanto na freqüência dos pulsos de LH. A progesterona, neste momento, se encontra em níveis basais. Então, nas fases de proestro e estro, há crescimento folicular na falta de um CL funcional, e o principal hormônio produzido é o estrógeno. A fase que sucede o estro é a de metaestro, que se inicia no momento em que a fêmea não aceita mais a monta e nela ocorre a ovulação, com a formação do corpo hemorrágico e, posteriormente, corpo lúteo. Os níveis de progesterona começam a aumentar ao

redor do terceiro dia atingindo um platô ao redor do 12^o dia, já na fase de diestro, que se mantém até a luteólise (ao redor do 17^o dia). Esta nova fase, diestro, se caracteriza por um corpo lúteo funcional, nela ocorrem aumento de progesterona e baixos níveis de estrógeno (GRUNERT & GREGORY, 1989; NOAKES, 1997; NOAKES, 2001; MORAES, 2003).

Durante o metaestro, é possível a ocorrência de uma hemorragia por passagem de hemácias devido à súbita diminuição de estrógeno e aumento da progesterona (MORAES, 2003). Grunert & Gregory (1989), relatam que em novilhas, principalmente, pode ser observado 1 até 2 dias após o cio, a saída de muco sanguinolento, denominada “hemorragia metaestral”. Este sangramento está associado à ruptura de pequenos capilares no útero em consequência do alto nível de estrógenos.

O ciclo estral pode ainda ser dividido em estro, fase folicular e fase luteal (NOAKES, 2001). O período de estro é descrito como aquele em que a fêmea está receptiva ao macho. É de duração variável na vaca, entre 8 a 18 horas, principalmente em função da raça, sendo que nas zebuínas é mais curto e menos notório, além de noturno em 30 a 50% dos animais (BARROS et al., 1995; PINHEIRO, et al., 1998; GONZÁLEZ, 2002). A seqüência de ação esteroidal para a indução de cio é um período de elevada concentração de progesterona (corpo lúteo do ciclo anterior) seguido de sua queda e elevação de estradiol, sendo este último responsável pelas mudanças típicas do estro no trato genital e no comportamento permitindo a receptividade sexual, além de provocar a liberação de LH necessária para a ovulação. A fase folicular é definida como o período desde a regressão do corpo lúteo até a ovulação e dura de 4 a 5 dias. O maior aumento de estradiol ocorre durante a fase folicular, com pico no estro; ao longo desta fase, as concentrações de LH são paralelas com as de estradiol, ao passo que os níveis de FSH são constantes ou podem até diminuir. O corpo lúteo - CL maduro, característico da fase luteal, é arredondado com um diâmetro de 20 a 25 mm e peso de 5 g. Depois da ovulação, o corpo lúteo é formado à partir das células da granulosa do folículo ovulado, as células da teca interna e da granulosa sofrem mudanças morfo-bioquímicas no processo chamado luteinização, como consequência do aumento de LH no período pré-ovulatório. A luteólise sempre ocorre quando não há um embrião viável no útero no dia 16 do ciclo, sendo este o

evento responsável pela duração do ciclo estral (BÓ et al., 2000; GONZÁLEZ, 2002).

Durante a fase luteal existe crescimento de folículos apesar da natureza inibitória da progesterona, principal hormônio secretado pelo CL durante esta fase, de forma que a fase luteal e folicular se sobrepõem. Nos primatas não ocorre sobreposição, estando as fases bem definidas; e apesar do crescimento folicular durante a fase luteal, a ovulação somente ocorre na fase folicular (GONZÁLEZ, 2002).

4. Avaliação Anatômica e Histológica

O útero é composto de dois cornos uterinos, um corpo e um cérvix. É do tipo bipartido (*uterus bipartitus*) na vaca, ovelha e égua, pois apresenta um septo que separa os dois cornos e um proeminente corpo uterino. O útero é um órgão altamente capacitado e adaptado a reconhecer e nutrir o produto da fertilização, desde a implantação até o parto (HAFEZ & JAINUDEEN, 2000), portanto, este órgão desempenha um papel crítico na manutenção e desenvolvimento do embrião e o seu estudo fornece muitas informações úteis na avaliação da fertilidade.

Nos bovinos adultos, o útero situa-se quase inteiramente dentro da cavidade abdominal. O corpo só tem aproximadamente 3 a 4 cm de comprimento, embora externamente pareça ter aproximadamente 12,5 a 15 cm de comprimento. Esta falsa impressão é devida ao fato das partes caudais dos cornos estarem unidas por tecido muscular e conjuntivo e possuírem uma cobertura peritoneal comum. Os cornos, portanto, são realmente mais extensos do que parecem externamente e possuem um comprimento médio de aproximadamente 35 a 40 cm. Afunilam-se gradativamente no sentido da extremidade livre, de modo que a junção com as tubas não é repentina, como na égua (SISSON, 1986).

O cérvix tem a forma transversa com saliências fixas conhecidas por anéis anulares, sendo especialmente proeminentes na vaca (ao redor de 4 anéis) (HAFEZ & HAFEZ, 2000); este possui aproximadamente 10 cm de comprimento, sua parede é muito densa e pode ter aproximadamente 3 cm de espessura. A parte vaginal do útero está tão fundida ventralmente com a vagina que o fórnix da

vagina tem aproximadamente 3,5 cm de profundidade dorsal, enquanto ventralmente é extremamente raso ou está ausente (SISSON, 1986).

A parede uterina é dividida em três regiões diferentes: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio, e a serosa ou perimétrio. O endométrio (túnica mucosa) é constituído por duas zonas que diferem em estrutura e função. A camada mais superficial chamada de zona funcional degenera-se parcialmente ou totalmente após a gestação ou estro. A camada mais profunda, zona basal, permanece intacta após esses eventos (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). A zona funcional é tradicionalmente dividida em dois estratos, o compacto e o esponjoso, baseado na aparência morfológica que esses estratos apresentam durante o ciclo estral.

O epitélio de superfície da zona funcional é pseudo-estratificado e/ou colunar simples em ruminantes, podendo ser, em áreas isoladas, cúbico simples (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Os bordos apicais das células colunares possuem numerosas especializações digitiformes da membrana plasmática, as microvilosidades, estas variam de altura de acordo com a atividade secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea em relação à fase folicular (STINSON et al., 1962).

O tecido sub-epitelial da região mais superficial da zona funcional (estrato compacto) consiste de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado com muitos fibrócitos, macrófagos e mastócitos, mas neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos também podem ser encontrados. A região mais profunda (estrato esponjoso) dessa zona consiste também de tecido conjuntivo frouxo, sendo este menos celularizado. Em ruminantes, durante o estro, uma grande quantidade de fluído deposita-se nos espaços teciduais na zona funcional, dando origem ao edema endometrial (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Em todo o endométrio estão presentes glândulas uterinas tubulares simples, enoveladas e ramificadas, sendo ausentes na região da carúncula em ruminantes (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). O epitélio glandular é similar ao luminal, exceto pela presença de cílios na superfície livre de muitas células colunares (STINSON et al., 1962). As carúnculas são espessamentos circunscritos da lâmina própria, ricas em fibroblastos e com extenso suprimento sangüíneo, sem, no entanto, possuírem glândulas uterinas. Aproximadamente quatro fileiras com 15 carúnculas estão presentes em cada corno uterino

(DELLMANN & BROWN, 1982; PRIEDKALNS & LEISER, 1998). SISSON (1986), apresenta como característica do endométrio de vacas a presença de carúnculas uterinas, estas são descritas como proeminências ovais, em número de aproximadamente cem, que estão irregularmente distribuídas sobre a superfície ou dispostas em fileiras de aproximadamente uma dúzia cada. No útero não gravídico medem aproximadamente 15 mm de comprimento e um pouco menos na largura e espessura. Durante a gravidez tornam-se muito aumentados e pedunculados (ao redor de 10 a 12 cm de comprimento). A face profunda possui um hilo no qual os vasos penetram. O restante da superfície tem uma aparência esponjosa, devido às numerosas criptas que recebem as vilosidades coriônicas.

Em relação ao miométrio (túnica muscular do útero), este é mais espesso que o da égua (SISSON, 1986); e é formado por uma espessa camada circular interna e uma camada longitudinal externa de células musculares lisas que aumentam em número e tamanho durante a gestação. Entre as duas camadas ou profundamente na camada interna, há uma zona vascular constituída de grandes artérias, veias, e vasos linfáticos, o estrato vascular (BANKS, 1992; DELLMANN & BROWN, 1982).

A terceira camada do útero, o perimétrio ou serosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo coberto por mesotélio peritoneal, possui numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas (PRIEDKALNS & LEISER, 1998; BANKS, 1992; DELLMANN & BROWN, 1982).

O cérvix atua como uma válvula para separar a luz uterina da vagina, sendo extremamente bem desenvolvido na vaca. As células de revestimento do cérvix são intensamente glandulares, sua atividade secretora varia com os estágios do ciclo estral e da prenhez. Um muco claro é secretado durante o estro e um selo cervical espesso é produzido durante a gestação. O epitélio do canal cervical da vaca é composto principalmente por células semelhantes às calciformes. A lâmina própria-submucosa varia de tecido conjuntivo frouxo a tecido conjuntivo denso durante os vários estágios do ciclo estral. A camada muscular é bem desenvolvida e rica em fibras elásticas (BANKS, 1992).

5. Ação Hormonal sobre o Útero

Sabidamente a morfologia do útero se modifica em sincronia com o ciclo estral. Várias mudanças ocorrem no endométrio de ruminantes, e estas são

provocadas pelos hormônios ovarianos estradiol e progesterona. Durante a exploração retal do útero percebe-se, na fase de proestro, uma maior contractilidade com aumento da turgidez de suas paredes conseqüente a congestão vascular. Esta contractilidade apresenta-se máxima na fase de estro, quando o útero responde de forma erétil ao toque; está reduzida na fase de metaestro e evolui para a ausência na fase de diestro.

NOAKES (2001), relata que um dia antes e um dia após, mas principalmente durante o estro, a camada muscular é fisiologicamente contrátil, esta característica associada a marcada vascularização é que provêm turgidez ao útero durante o exame retal; os cornos uterinos, por sua vez, apresentam-se eretos e em espiral.

Na vaca, nos três a quatro últimos dias do diestro, ocorre regressão da mucosa, com redução na altura do epitélio luminal, e as glândulas uterinas tornam-se curtas com epitélio baixo e sem secreção. No proestro, sob a influência de estrógeno, o endométrio é restaurado (início da fase proliferativa) (GRUNERT & GREGORY, 1989); a mucosa torna-se espessa, congesta e edematosa com a predominância de células secretoras de muco. Entretanto, a proliferação glandular limita-se a um crescimento linear das glândulas, sem ramificação ou enovelamento. Durante o estro, o edema e a hiperemia endometriais são marcantes (PRIEDKALNS & LEISER, 1998), a mucosa uterina revela hipertrofia e hiperplasia de grau considerável, dando a esta fase a denominação de proliferação endometrial (GRUNERT & GREGORY, 1989).

No metaestro, o edema diminui e hemorragias microscópicas ocorrem na zona funcional, caracterizando o processo de metrorragia. Na vaca, a metrorragia tem início antes da ovulação e atinge um máximo durante o edema endometrial, sendo mais proeminente nas regiões centrais das carúnculas e termina abruptamente no segundo dia após o estro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). NOAKES (2001), relata que entre 24 a 48 horas após o estro as carúnculas uterinas mostram hemorragias petequiais, dando origem a descarga vaginal sanguinolenta do metaestro. Nesta fase observa-se, no endométrio, a proliferação glandular (GRUNERT & GREGORY, 1989).

A atividade mitótica nos epitélios luminal, glandular e no estroma inicia-se durante o estro e continua por aproximadamente seis dias. Uma invasão de agranulócitos, essencialmente linfócitos, ocorre três a cinco dias após o estro

(PRIEDKALNS & LEISER, 1998); no entanto, VANDER WIELEN & KING (1984) não observaram uma variação significativa no número de linfócitos no endométrio durante o ciclo estral.

O aumento do número de eosinófilos ocorre do estro para o meio do ciclo, assim como o número de mastócitos durante o edema endometrial, especialmente nas regiões intercarunculares (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). MATSUDA et al. (1983), observaram um aumento significativo do número de eosinófilos no endométrio bovino, durante o estro e o metaestro em relação a outras fases do ciclo estral.

Com o início do diestro, sob a influência da progesterona, o endométrio passa de um estágio proliferativo para um secretor, com espessamento do epitélio glandular, além de ramificação, enovelamento e secreção das glândulas (GRUNERT & GREGORY, 1989). Durante os primeiros 11 dias do diestro, a secreção glandular é grande, mas se a gestação não acontecer ocorre regressão das glândulas juntamente com a luteólise nos últimos três dias do diestro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY (1973), verificaram que as modificações uterinas durante as fases folicular e lútea do ciclo estral estavam relacionadas com a espessura e vascularização do endométrio e miométrio, e com o crescimento das glândulas uterinas. WORDINGER & DICKEY (1971) também observaram que as características histológicas do endométrio de vacas abatidas três dias após o cio foram: edema, aumento de vascularização na lâmina própria e do estroma tecidual.

GONZALES et al. (1985) observaram no endométrio de vacas normais, um epitélio com citoplasma eosinofílico homogêneo ou com vacúolos, durante as fases folicular e lútea, respectivamente. As glândulas uterinas variavam de tubulares retas a tortuosas e não mostravam evidências de alterações degenerativas e necróticas. Além disso, um infiltrado composto por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos encontrava-se distribuído uniformemente na lâmina própria, com a predominância de linfócitos.

No endométrio da porção média dos cornos uterinos de novilhas bovinas, OHTANI et al. (1993) relataram vários achados, tais como, mitoses glandulares durante o proestro e estro, metrorragia e edema no estroma durante o cio e no primeiro dia do ciclo, vacuolização supranuclear no epitélio glandular entre os dias

três e sete, infiltração leucocitária no epitélio superficial nos dias sete e oito e mitoses nas células do estroma no estro e meio da fase lútea. Ao contrário das outras fases do ciclo estral, não ocorreram modificações progressivas no endométrio durante a fase lútea tardia.

As glândulas estão distribuídas por todo o endométrio, exceto nas carúnculas, sendo maior seu número nos cornos uterinos em relação ao corpo. Apresentam-se relativamente retas, baixas, cubóides e com pouca secreção durante o cio; à medida que aumenta o nível de progesterona produzida pelo corpo lúteo em desenvolvimento, elas crescem, secretam e tornam-se mais sinuosas e complexas. Estas começam a regredir quando são também notados os primeiros sinais de regressão uterina. As células epiteliais da superfície do endométrio são relativamente altas durante o cio; dois dias após ativa secreção tornam-se baixas e cubóides (HAFEZ, 1995).

Independente das modificações funcionais que se produzem na mucosa uterina, é importante assinalar aquelas que ocorrem ao nível da musculatura uterina. Durante o ciclo as células musculares variam de tamanho. O desenvolvimento máximo é alcançado no cio e nos dois dias seguintes, estando sua capacidade contrátil subordinada ao equilíbrio hormonal estrógeno-progesterona (CUPPS & ASDELL, 1944 *apud* DERIVAUX, 1980).

6. Imunoistoquímica

Por mais de 100 anos os patologistas tem se apoiado no exame de cortes de material fixado em formaldeído e incluído em parafina como principal elemento do diagnóstico anatomopatológico. Com o ganho de experiência durante os anos, foi possível o reconhecimento da morfologia das células e tecidos, suas relações com diversas estruturas e características tintoriais, o que permite inferir dados sobre seu funcionamento normal e alterações celulares ou teciduais.

A técnica de imunoistoquímica - IHQ se tornou uma ferramenta de enorme utilidade, permitindo avanços espetaculares para o diagnóstico de algumas enfermidades e na histopatologia. A detecção exata de antígenos - Ag - em células e tecidos têm contribuído para o estudo dos mecanismos das enfermidades, expandido notavelmente o diagnóstico histopatológico, e adquire valor no prognóstico por reconhecer moléculas que se correlacionam com o

comportamento biológico de diversos processos (LEONG, 1991 *apud* GIMENO, 1995).

Segundo Gimeno (1995), esta técnica depende da interação Ag-Ac, e combinando técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas, permite localizar componentes tissulares definidos (“in situ”) mediante o emprego de anticorpos - Ac - específicos e moléculas marcadoras.

Devido ao emprego crescente da imunoistoquímica na área de reprodução animal é que pretende-se revisar seus principais conceitos e suas diferentes técnicas.

6.1. Fundamentos Imunológicos dos Métodos Imunoistoquímicos

Pode-se definir um Ag como toda substância, ou partícula animada ou inanimada, de qualquer constituição química, que frente a um organismo, não seja reconhecido como próprio e induza uma resposta humoral e/ou celular. Para induzir uma resposta imune de base humoral (produção de Ac), inicialmente o Ag precisa ser processado pelos macrófagos. Estes são encarregados de contatar posteriormente os linfócitos T-helper específicos contra cada uma das porções (epítopos ou determinantes antigênicos) em que se fragmentou o Ag. Uma vez que se produziu uma expansão clonal dos linfócitos T-helper, estes irão contatar os linfócitos B (também específicos contra cada fragmento inicial). Após a expansão clonal dos linfócitos B estes se transformam em células plasmáticas produtoras de Ac específicos contra cada um dos epítopos originais. Desta forma, se tem uma grande quantidade de Ac específicos de diferentes tipos que, em conjunto e concentrados no plasma sanguíneo, constituem um soro policlonal. Neste estado o soro imune está contaminado com elementos normais (como albumina, α e β globulinas, eletrólitos, e outros), então são utilizadas técnicas de precipitação, separando assim as frações séricas desejadas (GIMENO, 1995).

Um soro monoclonal é aquele que concentra grandes quantidades de Ac específicos contra um só epítipo. Este tipo de soro só é obtido em laboratório, mediante processos biológicos dirigidos. Esses processos consistem na inoculação de Ag purificados em ratos, induzindo neles a produção de grande quantidade de Ac específicos. Os ratos são posteriormente sacrificados para a extração do baço que contém grande quantidade de linfócitos B. Estas células são mescladas com células de mieloma (tumor de células plasmáticas) para

induzir a fusão de ambas (produção de hibridomas). Os hibridomas resultantes são separados em policubetas para seu crescimento. Cada uma produzirá um determinado tipo de Ac, devendo ser selecionado aquele que seja específico para o epítopo desejado (GIMENO, 1995).

6.2. Principais Técnicas de Imunoistoquímica

Todos os métodos se baseiam na conjugação de distintos marcadores com moléculas de imunoglobulinas. Após a reação Ag-Ac, o marcador é localizado de diversas maneiras, mas geralmente utiliza-se uma reação tintorial (GIMENO, 1995).

6.2.1. Técnicas de Imunoperoxidase (IPx)

Todos os métodos deste grupo possuem em comum o emprego da peroxidase – Px - (GRAHAM & KRNOVSKY, 1966 *apud* GIMENO, 1995). Nas técnicas de imunoperoxidase, a Px irá reagir com o substrato (H_2O_2) originando um complexo Px- H_2O_2 , este por sua vez irá reagir com um doador de elétrons dando como resultado final um produto corado (polímero insolúvel) e água. Existem distintos cromógenos capazes de reagir com o complexo e dar um precipitado corado insolúvel. O cromógeno mais utilizado é o 3,3'-diaminobencidina (DAB), que é específico para a Px, barato, fácil de obtenção, origina uma coloração marrom, visível ao microscópio ótico, além de ser muito estável (GIMENO, 1995).

6.2.1.1. Método Direto

A imunoglobulina específica dirigida contra o Ag de interesse se encontra marcada (quimicamente conjugada) com Px (NAKANE & PIERCE, 1966 *apud* GIMENO, 1995; AVRAMEAS, 1969 *apud* GIMENO, 1995). É uma técnica muito rápida e fácil de realizar, sendo a principal limitante o fato de só poder ser utilizada com um Ag. É um método pouco utilizado atualmente (GIMENO, 1995).

6.2.1.2. Método Indireto

Nesta técnica o Ac primário ou específico, sem estar conjugado, se liga ao Ag, e a sua localização necessita de um Ac secundário marcado com peroxidase que se liga ao anterior. É um método mais versátil, pois o Ac secundário pode ser

empregado com diferentes Ac primários. A sensibilidade deste método é 4 a 5 vezes maior que no método direto (POLAK & VAN NORDEM, 1986 *apud* GIMENO, 1995; LARSSON, 1988 *apud* GIMENO, 1995).

6.2.1.3. Método do Ac Ponte

O Ac primário ou específico não possui nada conjugado, o Ac secundário ou “ponte” é capaz de se unir ao Ac primário e a um Ac anti-peroxidase que é colocado em um terceiro passo. Finalmente se incubava o sistema com peroxidase (MASON et al., 1969 *apud* GIMENO, 1995). Hoje não é mais utilizado.

6.2.1.4. Método da Peroxidase - Antiperoxidase (PAP)

Gimeno (1995), relata que este método implantou firmemente a técnica de IHQ. Este implica no emprego de 3 reativos: um Ac primário específico, um Ac secundário e o complexo PAP composto por três moléculas de Px e duas de imunoglobulina antiperoxidase. O Ac secundário ou “ponte” é capaz de unir-se ao mesmo tempo ao Ac primário e ao complexo PAP. O Ac primário e as imunoglobulinas do complexo devem ser da mesma espécie animal, e o Ac “ponte” deve ser específico contra essas imunoglobulinas.

6.2.1.5. Métodos que Utilizam a Interação Avidina – Biotina

Todas as variantes desta técnica se fundamentam na forte afinidade que existe entre a biotina e a avidina. A avidina é uma glicoproteína normalmente presente na clara de ovo. A biotina é uma vitamina do complexo B de peso molecular muito baixo, esta pode se conjugar facilmente com a fração Fc das imunoglobulinas, sem afetar em nada a capacidade dos Ac de se unirem ao Ag específicos, além de poder se acoplar a Px (várias moléculas de biotina em cada molécula de Px). Em cada molécula de Ac pode-se conjugar até 150 moléculas de biotina (ROBINSON et al., 1990 *apud* GIMENO, 1995). Além disso, a avidina possui quatro sítios de ligação onde a biotina se liga de forma irreversível.

6.2.1.5.1. Método da Avidina – Biotina

Neste método são utilizados quatro reativos, o primeiro é o Ac primário não conjugado, seguido do Ac secundário conjugado com biotina e capaz de se unir ao primeiro. O terceiro é a avidina e, por último, a peroxidase biotinilada. A técnica

apresenta como inconveniente o fato da avidina ter a tendência de se ligar de forma inespecífica a membranas celulares e ácidos nucleicos (GIMENO, 1995).

6.2.1.5.2. Método do Complexo Avidina - Biotina - Peroxidase (ABC)

Também se baseia na união entre a avidina e a biotina conjugada com a peroxidase. Compreende três passos: incubação com o Ac primário, incubação com o Ac biotilado e, por último, aplicação do complexo avidina – biotina – peroxidase. A solução utilizada por último deve ser preparada 30 minutos do uso, misturando-se avidina e peroxidase biotilada; este processo leva a formação de um enorme complexo com numerosas moléculas de peroxidase, e com um aumento da sensibilidade que se estima 20 a 40 vezes maior que na técnica de PAP. O grande tamanho do complexo pode ocasionar precipitação inespecífica e pobre penetração nos tecidos (GIMENO, 1995). HSU et al. (1981) relatou uma superioridade desta técnica quando comparada com o método PAP.

6.2.1.5.3. Método da Streptavidina – Biotina Marcada

Segundo Gimeno (1995), o uso da proteína produzida pelo *Streptomyces avidinii* (streptavidina) é uma forma de sanar o inconveniente da avidina de ter a tendência de se ligar de forma inespecífica a membranas celulares e ácidos nucleicos, pois possui a mesma afinidade a biotina e mostra ter menos tendência a se ligar a elementos celulares. O primeiro passo consiste na incubação com o Ac primário, seguido pelo Ac biotilado e por último a solução de Streptavidina marcada com peroxidase. É considerada de 4 a 8 vezes mais sensível que o ABC, é mais rápida e pode ser usada indistintamente com um soro primário monoclonal de rato ou policlonal de coelho.

6.2.1.5.4. Método do Polímero Marcado e Conjugado com Anticorpos Secundários

É o método mais recente. Se baseia no emprego de um polímero marcado com peroxidase e conjugado com imunoglobulinas anti-rato e anti-coelho. A técnica se reduz a apenas duas incubações: com o Ac primário e com o polímero (GIMENO, 1995).

6.2.2. Técnicas de Fosfatase Alcalina (AP)

6.2.2.1. Método da Fosfatase Alcalina - Antifosfatase Alcalina (APAAP)

Esta técnica se baseia no emprego de um complexo imune composto por duas moléculas de fosfatase alcalina (AP) extraídas de intestino de bezerro e uma de imunoglobulina anti-fosfatase alcalina. Como a técnica de PAP, este método também utiliza um complexo imune solúvel. Sua principal vantagem é a ausência de interferência com a atividade da peroxidase endógena, como consequência deve ser utilizada, principalmente, em cortes com alta concentração de peroxidase interna (baço, medula óssea) (CORDELL et al., 1984 *apud* GIMENO, 1995).

6.2.3. Técnicas que empregam outras Enzimas

Além das técnicas de peroxidase e de fosfatase alcalina, outras enzimas são empregadas como marcadores para IHQ. Entre elas, a glucose oxidase extraída do *Aspergillus niger* e a beta-galactosidase obtida a partir de uma cepa de *Escherichia coli* (SUFFIN et al., 1979 *apud* GIMENO, 1995; BONDI et al., 1982 *apud* GIMENO, 1995; VAN NOORDEM, 1986 *apud* GIMENO, 1995; BOENISCH, 1989 *apud* GIMENO, 1995).

6.2.4. Métodos Baseados no Emprego do Ouro Coloidal

Gimeno (1995), relata que durante a década de 70 se estendeu o uso do ouro coloidal em microscopia eletrônica, baseados na união de partículas de ouro a imunoglobulinas.

6.2.4.1. Método da Prata - Imune - Ouro

As partículas de ouro são demasiadamente pequenas para serem observadas ao microscópio óptico. Nesta técnica um Ac específico vai se unir ao Ag tissular. O segundo Ac marcado com uma partícula de ouro, se une ao Ac primário de maneira similar ao descrito no método IPx indireto. O terceiro passo consiste em detectar a presença da partícula de ouro com uma solução argêntica de coloração negra que se deposita sobre a partícula, permitindo sua observação ao microscópio óptico (GIMENO, 1995).

6.3. Requerimentos das Técnicas de Imunoistoquímica

Estas técnicas dependem da interação Ag-Ac, conseqüentemente dois fatores críticos devem ser considerados, a preservação dos Ag e o manejo dos Ac (GIMENO, 1995).

6.3.1. Preservação dos Antígenos

As técnicas de IHQ podem ser aplicadas em cortes de tecidos, cultivos celulares ou material citológico. Em todos os casos as células e os tecidos devem ser submetidos a um processo de fixação para freiar os processos autolíticos e preservar a morfologia. Todos os fixadores determinam perda ou mascaramento de Ag em maior ou menor grau, a suscetibilidade de cada determinante antigênico aos fixadores é variável (GIMENO, 1995).

Gimeno (1995) relata que os fixadores químicos empregados comumente podem ser classificados em três categorias: aldeídos, álcoois e metais pesados. O fixador ideal deve reunir as seguintes características: boa preservação da morfologia; não destruir a imunoreatividade dos Ag; prevenir a extração, difusão ou deslocamento dos Ag durante o processamento do material; e não interferir com as reações Ag-Ac empregadas para localizar o Ag (ROBINSON et al., 1990 *apud* GIMENO, 1995). O fixador mais utilizado na atualidade é o formaldeído. A fixação de pequenos fragmentos de tecido (5 a 10 mm) durante 6 a 24 horas leva a uma preservação morfológica ótima (FOX et al., 1985 *apud* GIMENO, 1995). O formaldeído confere rigidez aos tecidos mediante ligadura cruzadas entre cadeias polipeptídicas, sendo, na realidade, o processo quimicamente complexo e não completamente conhecido.

6.3.2. Manejo dos Anticorpos

A conservação, reconstituição e diluição de Ac é um elemento chave; de nada adianta uma preservação adequada do Ag, e um sistema de detecção de alta sensibilidade se o Ac estiver inadequado. É, então, conveniente fracionar o soro em pequenos volumes antes do congelamento, já que o congelamento e descongelamento repetitivos implicam em perda do título, dessa forma apenas a quantidade necessária será descongelada. Devem ser conservados entre -20°C ou -70°C , perdendo de 1 a 3% do título por ano (GIMENO, 1995).

As diluições de trabalho e tempo de incubação variam para os diferentes Ag e para cada soro; quando se trabalha com soros comerciais deve-se seguir as instruções do fabricante.

6.4. Controles

Vários autores, entre eles Gimeno (1995) relatam que na técnica de IHQ é essencial o uso de controles, pelo menos, um corte como controle positivo e um negativo conhecidos devem ser corados junto aos tecidos testes.

6.5. Especificidade

É o critério mais importante para validar um método de IHQ, e ao mesmo tempo é o mais difícil de definir. A especificidade pode ser considerada a habilidade de um Ac em detectar um determinante antigênico com exclusão de outros (PETRUSZ, 1983 *apud* GIMENO, 1995).

6.6. Sensibilidade

A sensibilidade de um método IHQ pode ser definida como a menor concentração detectável de um Ag. É representada pela menor intensidade de coloração que pode ser distinguida da coloração de fundo (GIMENO, 1995).

6.7. Quantificação da Imunoistoquímica

De acordo com Gimeno (1995), os resultados dos métodos imunoistoquímicos estão geralmente referidos em relação a uma marcação forte, intermediária ou fraca, com um alto componente de subjetividade. Pelo menos em teoria, a informação poderia ser quantificada de três formas: número de elementos imunopositivos por área definida; grau de coloração; e quantidade de Ag presente em um compartimento definido. Na prática, os fatores metodológicos que podem modificar uma imunoreação são muito numerosos e impossíveis de controlar.

6.8. Custo Aproximado de uma Reação

O maior custo estará ligado ao salário do pessoal envolvido. Os soros específicos são geralmente bastante caros, entretanto, quando é feito um aproveitamento integral dos mesmos, o custo final é baixo. Deve-se adicionar

ainda outras soluções, como o cromógeno (DAB), H₂O₂, xilol, álcoois, meio de montagem, corante (geralmente hematoxilina), e outros, sendo estes, de valor bem reduzido (GIMENO, 1995).

7. Considerações Finais

O conhecimento a respeito da interação entres os hormônios do eixo hipotálamo - hipófise e o órgão alvo, neste caso o útero, são importantes tanto para o conhecimento da fisiologia da espécie bovina como para a implantação, de forma mais adequada, de diversas biotecnologias ligadas a reprodução.

A técnica de imunistoquímica vem sendo extensivamente estudada no campo veterinário, por ser capaz de estender os conhecimentos da fisiologia animal caracterizando inúmeros aspectos químicos e bioquímicos dos eventos que ocorrem no organismo animal.

8. Referências

BANKS, W.J. Sistema Reprodutor Feminino. In: --- **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 27, p. 565 – 588.

BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, p.9-22, 1995.

BARROS, C.M.; BETTS, J.G.; THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon- in cows: effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. **Journal of Endocrinology**, v. 133, p. 175-182, 1992.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinâmica Folicular Ovária em el Bovino. **Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes**. Universidade de São Paulo, 2000.

DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. In: ---- **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397p.

DERIVAUX, J. Modificações Histofisiológicas do Trato genital durante o Ciclo Estral. In: **Reprodução dos Animais Domésticos**. Zaragaza: Acribia,1980. p. 20-33.

FERNANDES, C. A. C. **Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a taxa de gestação de novilhas mestiças usadas como receptoras de embriões**. 1994. 63f. Dissertação (Mestrado em

Reprodução Animal). - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p. 225-232, 1994.

GIMENO, E.J. Fundamentos de Imunohistoquímica Aplicada a Patologia Veterinária. In: 7 ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. Proceedings...1995, 35 p.

GONZALEZ, H.E.; CROWELL, W. A.; CAUDLE, A.B.; THOMPSON, F.N. Morphometric studies of the bovine uterus; Microscopic lesions and retrospective history. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2588-2595, 1985.

GONZÁLEZ, F.H.D. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrand/>. Acesso em 20 de abril de 2003.

GRUNERT, E. Sexualzyklus, Brunsterkennung, ovarielle Dysfunction. In: Grunert, E. und Berchtold, M. (HRSG): **Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind**. Paul Parey, Berlin –Hamburg, 1982.

GRUNERT, E.; GREGORY, R.M. **Diagnóstico e Terapêutica da Infertilidade na Vaca**. 2 ed. Porto Alegre: Sulina, 1989. 163p.

HAFEZ, E. S. E. Ciclos Reprodutivos. In: --- **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 95-114.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M.R. Reproductive Cycles. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 55-66.

HSU, S.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of Avidin – Biotin – Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, U.S.A., v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

MATSUDA, H.; OKUDA, K.; IMORI, T. Tissue concentrations of eosinophils in the bovine oviduct and uterus at different stages of the oestrous cycle. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 369-370, 1983.

McDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1989.

MORAES, I.A. Reprodução nas Fêmeas. São Paulo, 2003 Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br>. Acesso em 20 de março de 2003.

NOAKES, D.E. **Fertility and Obstetrics in Cattle**. 2 Ed. London:University Press, 1997. 145p..

NOAKES, D.E. Endogenous and Exogenous Control of Ovarian Cyclicity. In: NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, C.G.W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 8 Ed. London: Saunders, 2001. Cap. 1, p. 2-53.

OTHANI, S.; OKUDA, K.; NISHIMURA, K.; MOHRI, S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, v.39, p. 1033-1042, 1993.

PINHEIRO O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrous-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.

PRIEDKLNS, J.; LEISER, R. Female Reproductive System. In: DELLMANN, H.D.; EURELL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 247-286.

SISSON, S. Aparelho Urogenital. In: GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap. 31, p.879 - 895.

STINSON, M.W.; WEBER, A.F.; ZEMJAMIS, R. The Bovine Endometrium – An Electron Microscopic Study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, n. 97, p. 1164-1182, 1962.

SUNDARAVADANAN, V.K.; VENKATASWAMY, V. Histology and histochemistry of bovine uterus. **Indian Journal of Animal Science**, v. 43, n. 12, p. 1050-1053, 1973.

VANDER WIELEN, A.L.; KING, G.J. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrous cycle and early gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 457-462, 1984.

WILTBANK, M. C.; SHIAO, T. F.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Prostaglandin f-2α receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 74-78, 1995.