

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

JONAS GOMES FLORES

**RECEPTORES DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE EM DIFERENTES
PORÇÕES DO OVIDUTO DE ÉGUAS EM ESTRO**

Porto Alegre

2011

JONAS GOMES FLORES

**RECEPTORES DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE EM DIFERENTES
PORÇÕES DO OVIDUTO DE ÉGUAS EM ESTRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal, sob a orientação da Prof^a. Dra. Sandra Mara da Encarnação Fiala.

Porto Alegre

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Flores, Jonas Gomes

RECEPTORES DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE EM DIFERENTES
PORÇÕES DO OVIDUTO DE ÉGUAS EM ESTRO / Jonas Gomes
Flores. -- 2011.

30 f.

Orientadora: Sandra Mara da Encarnação Fiala.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Reprodução em Equinos. 2. Oviduto. 3.
Receptores para LH . 4. Imunoistoquímica. I. Fiala,
Sandra Mara da Encarnação, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JONAS GOMES FLORES

**RECEPTORES DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE EM DIFERENTES PORÇÕES DO
OVIDUTO DE ÉGUAS EM ESTRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal, sob a orientação da Prof^a. Dra. Sandra Mara da Encarnação Fiala.

APROVADO POR:

Prof^a. Dra. Sandra Fiala
Orientadora

Prof^a. Dra. Adriana Neves
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malzchitsky
Membro da Comissão

Prof^a. Dra. Caroline Antoniazzi Wolf
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha família por todo o apoio que recebo em minha vida.

Agradeço muito a minha orientadora Sandra Fiala pela orientação e paciência na execução deste trabalho.

Agradeço a professora Anamaria Esmeraldino e a médica veterinária Luisiane Santarém pela ajuda na confecção e leitura das lâminas.

Agradeço a minha namorada pela compreensão e ajuda nos momentos difíceis.

Agradeço ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos - UFRGS, pela iniciativa de desenvolver um programa de mestrado e doutorado exclusivo em equinos no Brasil e por compartilhar os seus conhecimentos com os alunos.

Agradeço a todos os meus colegas de curso, em especial o colega e amigo Emílio Borba e Liana Salles pelas inúmeras viagens que fizemos juntos para Porto Alegre.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos.

RESUMO

Receptores do hormônio luteinizante em diferentes porções do oviduto de éguas em estro

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do oócito pelo espermatozóide no interior do oviduto. O oviduto é um órgão tortuoso que mede de 20 a 30cm e está dividido em três porções: istmo, ampola e infundíbulo. Os hormônios influenciam a atividade das células-alvo pela ligação de moléculas receptoras específicas. A imuno-histoquímica é o conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para detecção de antígenos presentes em células ou tecidos, portanto, através desta técnica é possível verificar a presença de receptores hormonais em determinados órgãos. Este estudo teve como objetivo localizar a presença de receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas diferentes porções do oviduto utilizando a técnica de imuno-histoquímica. Foram utilizadas 18 éguas que se encontravam em estro, ou seja, apresentavam um folículo maior que 35mm e trato reprodutivo condizente com a fase estrogênica do ciclo estral. Das 18 éguas utilizadas neste trabalho, 16 éguas (88,8 %) apresentaram receptores para hormônio luteinizante (RLH) no oviduto. Destas 16 éguas, 8 (44,4 %) apresentaram RLH no epitélio e 7 (38,8 %) apresentaram RLH no tecido muscular do istmo, 14 (77,7 %) apresentaram RLH no epitélio e 13 (72,2 %) no tecido muscular da ampola, 10 (55,5 %) apresentaram RLH no epitélio e 1 (5,5 %) no tecido muscular do infundíbulo. Nas éguas que apresentaram receptores no epitélio a intensidade verificada foi de 1,5; 2,5 e 2,6 no istmo, ampola e infundíbulo, respectivamente enquanto que na porção muscular foi de 1,14; 2,3 e 3 respectivamente, para cada uma das três porções estudadas. Foi verificada uma maior intensidade de receptores na ampola do oviduto, o que pode relacionar o LH no processo de fecundação do oócito pelo o espermatozóide.

Palavras-chave: Égua. Oviduto. Receptor Hormonal. Imuno-hisotquímica. Hormônio luteinizante.

ABSTRACT

Receptors for luteinizing hormone in different portions of the oviduct of mares in estrus

Embryonic development begins with the fertilization of the egg by the sperm in the oviduct. The oviduct is a tortuous organ which extended measures 20 to 30cm and is divided into three parts: the isthmus, ampulla and infundibulum. Hormones influence the activity of target cells by binding to specific receptor molecules. Immunohistochemistry is the set of procedures that use antibodies as reagents for detection of specific antigens present in cells or tissues, therefore, using this technique it is possible to verify the presence of hormone receptors in certain organs. This study aimed to verify the presence of hormone receptors for luteinizing hormone (LH) in different portions of the oviduct using the technique of immunohistochemistry. We used 18 mares were in estrus that had a follicle greater than 35mm and reproductive tract consistent with the estrogen phase of the estrous cycle. From the 18 mares that were part of that study, 16 mares (88.8 %) had receptors for luteinizing hormone (RLH) in the oviduct. From these 16 mares, 8 (44.4 %) had RLH in the epithelium and 7 (38.8 %) had RLH in the muscle of the isthmus, 14 (77.7 %) had RLH epithelium and 13 (72.2 %) in the muscle of the ampulla, 10 (55.5 %) had RLH in the epithelium m and 1 (5.5 %) in the muscle of the infundibulum. In mares that had receptors in the epithelium the intensity verified was 1,5 ; 2,5 and 2,6 on the isthmus, ampulla and infundibulum, respectively while in the muscular portion was 1,14 ; 2,3 and 3 respectively, for each of the three portions studied. It was verified a greater intensity of receptors in the ampulla of the oviduct, which may relate the LH in the process of fertilization of the oocyte by the sperm.

Key words: Mare. Oviduct. Hormone receptors. Immunohistochemistry. Luteinizing hormone.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Intensidade de receptores no epitélio da tuba uterina de éguas em estro 25

Tabela 2 - Intensidade de receptores na túnica muscular da tuba uterina de éguas em estro 25

LISTA DE ABREVIATURAS

- CL – corpo lúteo
- cm - centímetros
- °c – graus Celsius
- DP – desvio padrão
- FSH – hormônio folículo estimulante
- GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
- h – horas
- IgG - imunoglobulina
- HCG – gonodotrofina coriônica humana
- H-E – hematoxilina-eosina
- LH – hormônio luteinizante
- PAP – peroxidase-anti-peroxidase
- PGE2 – prostaglandina
- RLH – receptor para hormônio luteinizante
- SNC – sistema nervoso central
- › - sinal de maior
- % - porcentagem

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 O AGRONEGÓCIO DO CAVALO NO BRASIL	12
1.2 CICLO ESTRAL DA ÉGUA	12
1.3 HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO	13
1.4 OVIDUTO	14
1.4.1 Anatomia do Oviduto	15
1.4.2 Histologia do Oviduto	16
1.5 RECEPTORES HORMONAIIS	17
1.6 IMUNOHISTOQUÍMICA	18
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	20
CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	28

INTRODUÇÃO

A espécie eqüina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (Ginther, 1992). Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas técnicas de manejo, geradas a partir da intensa pesquisa nas últimas décadas, alguns gargalos ainda permanecem na produção eqüina. Como explicações para a morte embrionária precoce e a não fecundação de oócitos.

Os espermatozoides depositados no trato genital da égua devem atravessar o útero, passar para o oviduto, através da junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o oócito (Berger 1996). Em eqüinos vários estudos demonstram que um grande número de espermatozoides está presente no oviduto após quatro horas da cobertura ou inseminação (RICKETTS, 2008; FIALA et al., 2007).

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do oócito (GINTHER, 1992). A partir deste momento, até o estabelecimento de uma placenta madura e funcional, aproximadamente aos 150 dias, uma série de alterações morfológicas, imunológicas e endocrinológicas ocorre no oviduto e útero, as quais podem ser presumidas como importantes componentes do estabelecimento e manutenção do estado gestacional (ALLEN, 2000).

Alguns estudos, avaliando amostras do trato reprodutor de éguas através da técnica de imuno-histoquímica observaram que, a exemplo de outras espécies, receptores para LH se expressam no oviduto, útero e cérvix, com diferentes intensidades em diferentes estruturas de um mesmo órgão e em função da fase do ciclo estral (ESMERALDINO et al., 2009).

Gawronska et al., (2000) demonstraram não só a presença, mas a funcionalidade destes receptores, sugerindo que o estradiol promove a síntese de RLH no epitélio e músculo liso e a ação do LH atua no relaxamento do oviduto e aumento da síntese de glicoproteínas que auxiliam no desenvolvimento embrionário, principalmente no período periovulatório de outras espécies como suínos, bovinos e até mesmo em humanos, mas não há relatos de sua função no oviduto de éguas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O AGRONEGÓCIO DO CAVALO NO BRASIL

A eqüinocultura constitui importante segmento do agronegócio brasileiro. Além de sua ligação com a pecuária comercial, a atividade possui forte inter-relação com setores ligados ao lazer, à cultura, ao esporte e ao ecoturismo. O Brasil possui o quarto maior rebanho eqüino do mundo, com 5,5 milhões de cabeças, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, México e da China (FAO, 2011).

O agronegócio do cavalo no Brasil é responsável pela geração de aproximadamente 3,2 milhões de empregos, dos quais seiscentos mil diretos, o que representa seis vezes a quantidade gerada pela indústria automotiva (Lima et al., 2006), sendo, portanto, uma atividade importante para o país, tanto econômica como socialmente.

Baixas taxas de fertilidade acarretam num menor número de potros nascidos, levando a grandes perdas econômicas tanto para proprietários como para as pessoas que trabalham no ramo da eqüinocultura.

1.2 CICLO ESTRAL DA ÉGUA

As éguas apresentam atividade sexual durante a fase de maior luminosidade do ano (primavera e verão), sendo classificadas como poliéstricas estacionais. Elas atingem a maturidade sexual (puberdade) por volta dos dois anos de idade, podendo ser esta alterada pela influência da condição corporal, peso, níveis de energia, ferormônios, raça e estação do ano (KOOISTRA, 1975).

O ciclo estral é tipicamente definido como o intervalo entre duas ovulações. O início ocorre com a ovulação (dia 0) e o término ocorre no dia anterior à próxima ovulação. A média de intervalo entre as ovulações, para a maioria das éguas, é de 21 dias, mas pode oscilar entre 18 e 24 dias (LEY, 2006).

A fase estral (fase folicular) pode durar de 3 a 7 dias e é dominada por um ou mais folículos pré-ovulatórios (Graaf) grandes (> 30mm de diâmetro), aumento no estradiol circulante, por sinais comportamentais de estro e receptividade ao garanhão (LEY, 2006).

A fase de diestro (fase luteínica) dura 13 a 17 dias e é dominada por um corpo lúteo, pela progesterona e por sinais comportamentais indicando ausência de receptividade à aproximação do garanhão (LEY, 2006).

1.3 HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO

Ao longo do tempo, o controle da reprodução dos mamíferos deixou de ser considerado como regulado apenas pelo sistema nervoso central (SNC), passando a ser visto como uma função controlada por dois sistemas separados: o sistema nervoso central e o sistema endócrino. A seguir descobriu-se que o hipotálamo ligava esses dois sistemas por meio do sistema porta-hipotálamo-hipofisiário, coordenando as funções das gônadas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Para um melhor entendimento da fisiologia da reprodução em éguas é necessário fazer uma revisão sobre os hormônios e glândulas envolvidas nesta função.

A glândula pineal está diretamente ligada ao fotoperíodo, onde a redução da luz faz com que ocorra uma maior produção de melatonina. Esta tem um efeito inibitório sobre o hipotálamo (MCKINNON, 2009).

O hipotálamo secreta GnRH no sistema porta-hipotálamo-hipofisiário promovendo a liberação de LH e FSH pela hipófise anterior.

O FSH tem a função de estimular o crescimento e a maturação do folículo ovariano e o LH é responsável pela ruptura da parede folicular e ovulação (CAPEN et al., 1989).

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem não só o comportamento de estro como também a elevação dos níveis de LH, e ativação dos receptores para LH nas células da granulosa e conseqüentemente a ovulação e a formação do corpo lúteo (MCKINNON & VOSS, 1993).

A secreção de progesterona é necessária para manutenção da prenhez normal em todas as espécies domésticas. A progesterona é um dos hormônios chave para o controle da função reprodutiva em éguas. O corpo lúteo produz progesterona aproximadamente até 14 a 15 dias após a ovulação e a secreção de

prostaglandina pelo útero é responsável pela regressão desse corpo lúteo (VALE et al., 1994).

A progesterona promove o encerramento dos sintomas de estro, mantém a fêmea não receptiva ao macho e também prepara o útero para a chegada do embrião. Quando a fêmea se encontra gestante, a manutenção do corpo lúteo é mediada pela presença do embrião no lúmen uterino. A secreção contínua de progesterona é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas eqüinas (ARRUDA et al., 2001).

Durante os primeiros 120 dias de gestação, a progesterona é produzida pelo corpo lúteo primário. Depois dos 40 dias de gestação, a progesterona produzida pelo CL primário é suplementada com progesterona produzida pelos CL secundários. A produção luteal de progesterona persiste aproximadamente até os dias 100, 150 de gestação. Começando por volta do dia 50 a 70 de gestação, uma notável produção de progesterona pela placenta sendo que esta se torna a única fonte de progesterona durante a segunda metade da gestação na égua (DAELS, 2006).

1.4 OVIDUTO

Os espermatozóides depositados no trato genital da égua devem atravessar o útero pela junção útero-tubárica, chegar ao oviduto, interagir com o epitélio destes e fertilizar o oócito (BERGER, 1996).

Nos cavalos, o principal local de armazenamento (reservatório espermático) parece ser o oviduto, especificamente a região caudal do istmo, onde ocorre a capacitação espermática (DELPECH & THIBAUT, 1993).

Também foi observada a presença de células espermáticas, a partir de uma hora após a inseminação, no interior das glândulas endometriais, os autores sugeriram que as glândulas uterinas podem ser mais um reservatório espermático (FIALA et al., 2007).

O encontro entre espermatozóide e oócito ocorre na ampola e contrações peristálticas da ampola aumentam a chance de contato entre os gametas masculino e feminino (SCHOMBERG, 1990).

Existem diferenças importantes no transporte de oócitos e embriões no oviduto eqüino quando comparado às outras espécies de mamíferos. Um fenômeno exclusivo é a retenção de oócitos não fecundados ou embriões não viáveis no

oviduto, sendo que estes podem ser retidos por até sete meses ou mais e são eventualmente degenerados. Essa retenção ocorre nas bordas tortuosas da mucosa do oviduto, podendo o ovócito se alojar no terço médio do oviduto ou na região da junção istmo-ampola (ALLEN, 2000; ALLEN, 2001).

Por outro lado, se o oócito é fecundado resultando em um embrião, ele atravessa a apertada e proeminente junção útero-tubaria, entrando no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação (dia 6 – 6,5) no estágio de desenvolvimento de mórula tardia ou blastocisto inicial (ALLEN, 2000).

A PGE2 produzida pelo o embrião quando esse se encontra em estágio de mórula compacta (5 dias após a ovulação), tem a propriedade de provocar contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, atuando na parede do oviduto, permitindo assim que o embrião se mova progressivamente com o auxílio do movimento ciliar rítmico, entrando no útero aproximadamente após 24h (GASTAL et al., 1998).

1.4.1 Anatomia do Oviduto

Os ovidutos das éguas possuem de 20 a 30 cm quando estendidos, e são divididos em três porções denominadas: infundíbulo, ampola e istmo, no sentido do ovário até o útero (GINTHER, 1992).

A ampola é altamente tortuosa, tem lúmen expandido, com cerca de 6 mm de diâmetro, já o istmo é reto e tem diâmetro de 2-3 mm. A transição da ampola para o istmo é gradativa. A divisão do infundíbulo para ampola ocorre no óstio abdominal. O infundíbulo tem formato de funil, e, em sua margem aparecem as pregas (fimbrias) que se fixam no ovário em um ponto, o pólo cranial do ovário. As fimbrias remanescentes se espalham sobre o ovário para cobrir a fossa de ovulação (LEY, 2006).

O istmo está conectado diretamente ao útero, penetrando no corno uterino da égua na forma de uma pequena papila (MINA et al., 2008).

Durante a ovulação o infundíbulo cobre a fossa de ovulação para facilitar a entrada do oócito no oviduto. A bursa ovariana da égua é uma bolsa delineada pelo peritônio. Estende-se da fossa ovulatória, caudalmente, até o aspecto cranial do corno uterino. Seu limite lateral é formado pela tuba uterina e pela mesossalpinge. O

limite medial é formado pelo ligamento próprio do ovário, que é uma folha do ligamento largo (MCKINNON, 1993).

1.4.2 Histologia do Oviduto

A parede externa do oviduto é coberta por um revestimento peritoneal (serosa), um tecido de suporte fibroso está abaixo da serosa. A camada muscular e a mucosa variam consideravelmente entre as porções do oviduto, fornecendo informações importantes quanto à divergência funcional das porções. A espessura da camada muscular aumenta do infundíbulo para o istmo, a muscular consiste de uma camada interna do músculo liso. As fimbrias do infundíbulo contêm poucas fibras musculares, a ampola contém uma fina camada de fibras, já o istmo possui a camada muscular bem desenvolvida (GINTHER, 1992).

A mucosa do oviduto é formada por pregas primárias, secundárias e terciárias. A mucosa da ampola possui pregas que se projetam para cima, em direção ao istmo, e a para baixo, no sentido da junção uterotubárica. A mucosa consiste de uma camada de células epiteliais colunares e o epitélio é constituído de células ciliadas e não-ciliadas (HAFEZ & HAFEZ, 1996).

O fluido produzido onde as células secretoras (não ciliadas) são mais abundantes (istmo e porção final da ampola) tem a função de capacitação e nutrição dos espermatozoides, também fornecendo um meio de movimentação para o oócito e os espermatozoides (GINTHER, 1992).

A porcentagem de células ciliadas diminui gradualmente na ampola em direção ao istmo e alcança o máximo na fimbria e no infundíbulo. As células ciliadas são mais abundantes na região onde o óvulo é captado, acima da superfície ovariana, enquanto as células secretoras são abundantes onde os fluidos luminiais são necessários, numa interação entre o oócito e o espermatozoide. A pulsação dos cílios ocorre em direção ao útero. Essa atividade, auxiliada pelas contrações do oviduto, mantém o oócito em constante rotação no oviduto, o que é essencial para juntar o oócito e o espermatozoide (fertilização), prevenindo, assim, uma implantação no próprio oviduto (MINA et al., 2008).

1.5 RECEPTORES HORMONAIIS

Os hormônios influenciam a atividade das células-alvo pela ligação de moléculas receptoras específicas. Os receptores são proteínas ou glicoproteínas. A localização celular do receptor depende da natureza química do hormônio que se ligará a esse receptor (DIEKMAN, 1978).

Os receptores intracelulares encontram-se no citoplasma ou no núcleo da célula. Os hormônios lipossolúveis atravessam a membrana celular para dentro do citoplasma ou então, para dentro do núcleo, ligando-se aos receptores intracelulares pelo processo de difusão (SEELEY et al., 2003).

Hormônios protéicos que não são solúveis a membrana citoplasmática das células alvo, devem agir a partir do exterior da célula. Portanto, receptores para esses hormônios que estão localizados dentro da membrana plasmática precisam de um sistema de segundo mensageiro para agir (STEPIEN, 2001).

Há uma serie de fatores que influenciam a quantidade de receptores para hormônios nas células alvo, incluindo outros hormônios e em muitos casos o próprio hormônio (BOLANDER, 1989).

Os receptores não são componentes fixos, podendo variar o número de receptores para cada tipo de célula, com isso variando o grau de resposta. O sítio de união é esteroespecífico, onde somente se une o hormônio correspondente ou moléculas similares. As estruturas análogas, denominadas “agonistas” se unem aos receptores, ocasionando os mesmos efeitos que o hormônio. Em oposição aquelas estruturas, cuja união ao receptor não causa efeito hormonal, por bloquear os receptores são chamados de “antagonistas” (GONZALEZ, 2006).

No ovário, o LH tem funções adicionais durante a indução da ovulação e diferenciação posterior das células da granulosa em células luteais, receptores para LH também tem sido detectados em tecidos extra gonadal, no entanto sua função nestes tecidos não é conhecida (Buech, 2007).

Os receptores hormonais podem ser medidos por métodos bioquímicos ou imuno-histoquímica, sendo que esta permite análises retrospectivas de material armazenado em blocos de parafina (MELO, 2002).

1.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica é o conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para detecção de antígenos presentes em células ou tecidos. O produto da reação antígeno-anticorpo é examinado ao microscópio em preparados citológicos e em cortes histológicos de amostras incluídas em parafina (FILHO, 2004).

Os anticorpos usados para detecção específica podem ser policlonais ou monoclonais. Anticorpos monoclonais são geralmente considerados mais específicos. Anticorpos policlonais são obtidos pela injeção de um antígeno peptídico em animais e, após a estimulação de resposta imune secundária, isolamento dos anticorpos a partir do soro. Portanto, anticorpos policlonais são uma mistura heterogênea de anticorpos que reconhecem diversos epítomos (VARA, 2005).

Anticorpos podem também ser classificados como reagentes primários ou secundários. Anticorpos primários são produzidos contra um antígeno de interesse e são tipicamente não-conjugados (não-marcados), enquanto anticorpos secundários são produzidos contra anticorpos primários. Assim, anticorpos secundários reconhecem imunoglobulinas de uma espécie particular e são conjugados à biotina ou a uma enzima como fosfatase alcalina ou uma peroxidase (WERENER et al., 2005).

Existem duas formas para a detecção imunohistoquímica de antígenos nos tecidos: o método direto e o método indireto.

O método direto é um método de coloração de um passo (one-step), e envolve um anticorpo marcado conjugado reagindo diretamente com o antígeno na amostra de tecido. Essa técnica utiliza apenas um anticorpo e o procedimento é, portanto, simples e rápido. Entretanto, pode sofrer problemas com sensibilidade devido à pequena amplificação de sinal e é menos comumente utilizado do que os métodos indiretos (PAES et al., 2008).

O método indireto envolve um anticorpo primário não-marcado (primeira camada) que reagem com o antígeno do tecido, e um anticorpo secundário marcado (segunda camada) que reagem com o anticorpo primário. (O anticorpo secundário deve se produzido contra a IgG da espécie animal em qual o anticorpo primário foi produzido.) Esse método é mais sensível devido à amplificação de sinal através de

diversas reações de anticorpos secundários com diferentes sítios antigênicos do anticorpo primário. A segunda camada de anticorpos pode ser marcada com corante fluorescente ou uma enzima (PAES et al., 2008).

A técnica de imunohistoquímica é usada na rotina diagnóstica e na pesquisa em patologia humana desde 1970, porém seu uso na patologia veterinária é relativamente recente, principalmente com objetivo diagnóstico. A maior dificuldade no uso da imunohistoquímica na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Na falta de anticorpos específicos para as espécies domésticas, a patologia veterinária frequentemente faz uso de anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais (RUIZ et al., 2005).

Na medicina, as áreas que mais tem recebido os benefícios dessa nova metodologia são as neoplasias e as doenças infecciosas, seja em relação ao diagnóstico mais preciso, seja em relação à etiopatogênese. Outra importante aplicação da imunohistoquímica é a pesquisa de receptores para hormônios (FILHO, 2004).

2 ARTIGO

RECEPTORES DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE EM DIFERENTES PORÇÕES DO OVIDUTO DE ÉGUAS EM ESTRO

Flores, J.¹; Esmeraldino, A.²; Rodrigues, R.³; Cruz, L.A.⁴; Fiala, S.M.⁵

RESUMO

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do oócito pelo espermatozóide no interior do oviduto. O oviduto é um órgão tortuoso que mede de 20 a 30cm e está dividido em três porções: istmo, ampola e infundíbulo. Os hormônios influenciam a atividade das células-alvo pela ligação de moléculas receptoras específicas. A imuno-histoquímica é o conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para detecção de antígenos presentes em células ou tecidos, portanto, através desta técnica é possível verificar a presença de receptores hormonais em determinados órgãos. Este estudo teve como objetivo localizar a presença de receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas diferentes porções do oviduto utilizando a técnica de imuno-histoquímica. Foram utilizadas 18 éguas que se encontravam em estro, ou seja, apresentavam um folículo maior que 35mm e trato reprodutivo condizente com a fase estrogênica do ciclo estral. Das 18 éguas utilizadas neste trabalho, 16 éguas (88,8 %) apresentaram receptores para hormônio luteinizante (RLH) no oviduto. Destas 16 éguas, 8 (44,4 %) apresentaram RLH no epitélio e 6 (37,5 %) apresentaram RLH no tecido muscular do istmo, 14 (77,7 %) apresentaram RLH no epitélio e 13 (72,2 %) no tecido muscular da ampola, 10 (55,5 %) apresentaram RLH no epitélio e 1 (5,5 %) no tecido muscular do infundíbulo. Nas éguas que apresentaram receptores no epitélio a intensidade verificada foi de 1,5; 2,5 e 2,6 no istmo, ampola e infundíbulo, respectivamente enquanto que na porção muscular foi de 1,14; 2,3 e 3 respectivamente, para cada uma das três porções estudadas. Foi verificada uma maior intensidade de receptores na ampola do oviduto, o que pode relacionar o LH no processo de fecundação do oócito pelo o espermatozóide.

Palavras-chave: Égua. Oviduto. Receptor hormonal. Imuno-histoquímica. Hormônio luteinizante.

¹ FLORES. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: equinos - UFRGS, Porto Alegre: Brasil.

² ESMERALDINO. Curso de Medicina Veterinária- ULBRA, Canoas: Brasil.

³ RODRIGUES. Departamento de Morfologia - Instituto de Biologia-UFPEL, Pelotas: Brasil.

⁴ CRUZ. Departamento de Morfologia - Instituto de Biologia-UFPEL, Pelotas: Brasil.

⁵ FIALA. Departamento de Morfologia - Instituto de Biologia-UFPEL, Pelotas: Brasil.

RECEPTORS FOR LUTEINIZING HORMONE IN DIFFERENT PORTIONS OF THE OVIDUCT OF MARES IN ESTRUS

ABSTRACT

Embryonic development begins with the fertilization of the egg by the sperm in the oviduct. The oviduct is a tortuous organ which extended measures 20 to 30cm and is divided into three parts: the isthmus, ampulla and infundibulum. Hormones influence the activity of target cells by binding to specific receptor molecules. Immunohistochemistry is the set of procedures that use antibodies as reagents for detection of specific antigens present in cells or tissues, therefore, using this technique it is possible to verify the presence of hormone receptors in certain organs. This study aimed to verify the presence of hormone receptors for luteinizing hormone (LH) in different portions of the oviduct using the technique of immunohistochemistry. We used 18 mares were in estrus that had a follicle greater than 35mm and reproductive tract consistent with the estrogen phase of the estrous cycle. From the 18 mares that were part of that study, 16 mares (88.8 %) had receptors for luteinizing hormone (RLH) in the oviduct. From these 16 mares, 8 (44.4 %) had RLH in the epithelium and 6 (37.5 %) had RLH in the muscle of the isthmus, 14 (77.7 %) had RLH epithelium and 13 (72.2 %) in the muscle of the ampulla, 10 (55.5 %) had RLH in the epithelium m and 1 (5.5 %) in the muscle of the infundibulum. In mares that had receptors in the epithelium the intensity verified was 1,5 ; 2,5 and 2,6 on the isthmus, ampulla and infundibulum, respectively while in the muscular portion was 1,14 ; 2,3 and 3 respectively, for each of the three portions studied. It was verified a greater intensity of receptors in the ampulla of the oviduct, which may relate the LH in the process of fertilization of the oocyte by the sperm.

Key words: Mare. Oviduct. Hormone receptors. Immunohistochemistry. Luteinizing hormone.

INTRODUÇÃO

O encontro entre espermatozóide e oócito ocorre na ampola e contrações peristálticas da ampola aumentam a chance de contato entre os gametas masculino e feminino (HAFEZ & HAFEZ, 2006).

A partir da fecundação até o estabelecimento de uma placenta madura e funcional, aproximadamente aos 150 dias, uma série de alterações morfológicas, imunológicas e endocrinológicas ocorre no oviduto e útero (ALLEN, 2000).

O hormônio luteinizante é uma glicoproteína estruturada em duas subunidades com 121 aminoácidos e 4 sítios de glicosilação, é sintetizado pelos gonadotrofos hipofisários de modo pulsátil, em resposta aos pulsos de GnRH (OLIVEIRA, 2000).

O LH tem como função induzir a ovulação e manter o corpo lúteo, além de estimular, junto com o FSH, a secreção de esteróides no ovário (estrógenos antes da ovulação e progesterona no corpo lúteo) (WEESNER, 1987).

Fields et al., (2004) descreve a presença de receptores hormonais extragonadais para LH, em diversas espécies como: humanos, bovinos, suínos, ratos e peru.

A presença de receptores para LH no oviduto de porcos e a mudança na quantidade de receptores, dependendo do estado hormonal dos animais, sugerem que o LH pode ser um fator importante na sincronização dos acontecimentos que levam a fertilização de óvulos na ampola. O LH também pode facilitar a passagem de embriões através do istmo para o útero (GAWRONSKA et al., 1999).

Esmeraldino et al., (2010) demonstraram a presença de receptores de LH no oviduto de éguas, porém sem elucidar a funcionalidade deste no oviduto de éguas, e também sem demonstrar se existe variação na presença de receptores deste hormônio nas diferentes porções do oviduto nesta espécie.

A base da imunohistoquímica é muito simples e esta ligada a três disciplinas científica: imunologia, histologia e química. O conceito fundamental por trás da imunohistoquímica é a demonstração de antígenos dentro de cortes de tecido por meio de anticorpos específicos. Uma vez que ocorre a ligação antígeno-anticorpo (ligação histoquímica), essa reação é visível por microscopia (VARA, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo através da técnica de imunohistoquímica verificar a presença e a intensidade de receptores hormonais para LH

nas diferentes porções do oviduto (istmo, ampola e infundíbulo) de éguas que se encontravam em estro.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

Foram utilizadas neste experimento 18 éguas destinadas a abate em um frigorífico localizado na cidade de Pelotas. As éguas foram submetidas a exame ginecológico, o qual consistia de palpação retal e ultrassonografia e as que se encontravam em estro, com folículo maior de 35mm e trato reprodutivo condizente com a fase estrogênica do ciclo estral, foram utilizadas. Após o abate o trato reprodutivo destas éguas foi coletado.

Processamento do material

Os ovidutos foram separados do restante do trato reprodutivo. Posteriormente foram seccionados em 3 porções, correspondentes a istmo, ampola e infundíbulo. As amostras foram colocadas imediatamente em frascos contendo formol tamponado a 4%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados, passando pelos alcoóis 70% e 96% passando também por três seções de álcool absoluto, permanecendo em cada álcool pelo período de uma hora. Em seguida a desidratação, os cortes foram diafanizados (clarificação) no xilol e colocados na parafina à temperatura 58-60°C por uma hora. Com o final dessa etapa os blocos de parafina foram confeccionados e colocados em um freezer para que ocorresse a solidificação.

No final desta etapa os blocos de parafina foram cortados no micrótomo a uma espessura de três micrometros e colocados em lâminas previamente tratadas por Histogrip®⁶, uma substância especial com a função de manter os cortes aderidos às lâminas durante o processamento.

⁶ Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/008050_Rev1109.pdf>

As lâminas foram colocadas em uma estufa a 60°C para que a parafina fosse derretida. Primeiramente foi realizada a coloração H-E para identificação das estruturas microscópicas de interesse, após a realização deste procedimento os cortes foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, pelo método de peroxidase-anti-peroxidase (PAP) para verificar a presença, distribuição e intensidade dos receptores para hormônio luteinizante.

Análise das lâminas

Distribuição dos receptores

As lâminas foram analisadas para verificação de receptores no epitélio e na túnica muscular de cada uma das porções do oviduto.

Intensidade dos receptores

As lâminas foram analisadas quanto a intensidade dos receptores em uma escala de 0 a 3, onde 0 era a ausência de coloração (reação negativa), o número um representa coloração fraca e o número dois representa coloração média e o número 3 representa coloração intensa (maior número de receptores).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada distribuição de freqüência e estatística descritiva. Foi utilizado um teste não paramétrico para análise de variância (Kruskal-Wallis).

RESULTADOS

Das 18 éguas utilizadas neste trabalho, 16 éguas (88,8 %) apresentaram receptores para hormônio luteinizante (RLH) no oviduto. Destas 16 éguas, 8 (44,4 %) apresentaram RLH no epitélio do istmo e 6 (37,5 %) apresentaram RLH no tecido muscular do istmo, 14 (77,7 %) apresentaram RLH no epitélio da ampola e 13 (72,2 %) no tecido muscular da ampola, 10 (55,5 %) apresentaram RLH no epitélio do infundíbulo e 1 (5,5 %) no tecido muscular do infundíbulo. Na tabela 1 observa-se a

intensidade dos receptores no epitélio de acordo com a porção do oviduto levando em consideração apenas as éguas que apresentaram receptores para LH. Nas éguas que apresentaram receptores no epitélio a intensidade verificada foi de 1,5; 2,5 e 2,6 no istmo, ampola e infundíbulo, respectivamente.

Tabela 1 - Intensidade de receptores no epitélio da tuba uterina de éguas em estro.

Local	Número	Média	DP (\pm)
Istmo	8	1,5	0,5345
Ampola	14	2,5	0,6504
Infundíbulo	10	2,6	0,6992

Na Tabela 2 observa-se a intensidade dos receptores na túnica muscular de cada uma das porções do oviduto considerando apenas as éguas que apresentaram receptores para LH, que na porção muscular foi de 1,14; 2,3 e 3 respectivamente, para cada uma das três porções estudadas.

Tabela 2 - Intensidade de receptores na túnica muscular da tuba uterina de éguas em estro.

Local	Número	Média	DP (\pm)
Istmo	6	1,33	0,5164
Ampola	13	2,3	0,4804
Infundíbulo	1	3	0

Não foi observada diferença significativa ($P = 0,4316$) na intensidade dos receptores no istmo da tuba uterina em relação ao tipo de tecido estudado (epitélio x músculo) o mesmo ocorrendo na ampola ($P = 0,3463$), no entanto houve diferença na avaliação do infundíbulo ($P = 0,001$), onde a intensidade de receptores foi maior no epitélio comparado ao músculo.

Verificou-se uma intensidade de receptores maior na ampola da tuba uterina quando se analisou a intensidade dos receptores no epitélio ($P = 0,000$) comparado a istmo e infundíbulo e na túnica muscular da ampola ($P = 0,0000$) comparado as demais porções.

DISCUSSÃO

Receptores para LH foram observados nas tubas uterinas de diferentes espécies (humanos, ovinos, bovinos, suínos, peru, ratos e equinos) (Fields et al., 2004; Esmeraldino et al., 2010). Estudos demonstrando a presença de receptores de LH nas diferentes porções das tubas ainda não haviam sido realizados na espécie equina, de acordo com a literatura estudada.

A imunomarcagem mais notável em humanos foi vista na mucosa do epitélio, sendo que a coloração do epitélio da ampola foi mais intensa para LHR do que no epitélio do istmo. O mesmo foi observado neste estudo, com a ampola apresentando uma maior marcação, independente do tecido estudado. A coloração da miossalpíngia foi menos intensa do que a mucosa (Lei et al. 1993), o que concorda com os achados deste estudo, com exceção da mucosa do infundíbulo, onde se observou uma maior intensidade de coloração, com apenas uma égua apresentando marcação na túnica muscular do infundíbulo. Uma distribuição similar de RLH foi encontrada em mulheres (LEI et al., 1993).

Em ratos, RLH não foram detectados na mucosa do oviduto, mas foram encontrados na serosa e em células subepiteliais do oviduto (ZHENG et al., 2001). Ainda não foi possível verificar se essas diferenças refletem diferenças entre as espécies ou são resultado de diferentes técnicas experimentais.

A presença de receptores de LH/hCG em várias células do oviduto, e mudanças na quantidade de receptores dependendo do estado hormonal do animal, sugerem que o LH pode modular contrações espontâneas do oviduto suíno, especialmente durante o período pré-ovulatório do ciclo estral (Gawronska et al., 1999), período que foi utilizado neste estudo, uma vez que as éguas estavam em estro.

Em resumo, suponhamos que o aumento do pico de LH na fase pré-ovulatória, além de causar a ruptura de folículos e luteinização das células da granulosa e da teca, desempenhe um importante papel no controle da contração do oviduto e também pode ser um fator importante, responsável pela abertura da junção istmo-ampola para o espermatozóide e para a sincronização da fertilização do óvulo na ampola. A ação relaxante do LH também pode facilitar a passagem de embriões através do istmo em direção ao útero (ZIECIK, 2005).

O encontro entre espermatozóide e oócito ocorre na ampola e contrações peristálticas da ampola aumentam a chance de contato entre os gametas masculino e feminino (Hafez & Hafez, 2006), esse fato pode estar relacionado a uma maior marcação observada nesta porção do oviduto, comparada a istmo e infundíbulo.

CONCLUSÃO

A intensidade de receptores foi maior no epitélio do infundíbulo comparado ao músculo.

A intensidade de receptores foi maior na ampola da tuba uterina tanto no epitélio como na túnica muscular comparado a istmo e infundíbulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN W. R. **The physiology of early pregnancy in the mare.** In: American Association of Equine Practitioners. Proceedings. 2000, 338-354p.

_____. **Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy.** Journals of Reproduction and Fertility. 2001, 513-527p.

ARRUDA, R. P.; VISITIN, J. A.; FLEURY, J. J. **Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterone plasmática em receptoras de embrião eqüinos?** São Paulo, 2001, v. 38, n. 5, p. 233-239.

BERGER, T. **Fertilization in ungulates.** Animal Reproduction Science. 1996, v. 42, 351-360p.

CAPEN, C. C.; MARTIN, S. L. **The pituitary gland.** In: McDonald LE, Pineda MH, eds. Veterinary Endocrinology and Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989, 80p.

BOLANDER, F. F. **Molecular Endocrinology.** San Diego – USA, Academic Press, 1989, 40-63p.

BUECH, T., NURWAKAGARI, P., GUDERMANNIAN, T. **Luteinizing hormone receptor.** Institute for Pharmacology and Toxicology, Philipps-Universyt Marbug, 2007, 10-20p.

DAELS, P. **Progesterone therapy and pregnancy loss.** 8th AAEP Annual Resort Symposium. Rome, Italy: January, 2006, 19-21p.

DELPECH, S.; THIBAUT, C. **Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation.** Reproduction in mammals and man, Paris: Ellipses, 1993, 268-278p.

DIEKMAN, M. A., O'CALLAGHAN, P., NETT, T. M., **Validation of methods and quantification of luteal receptors for LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes.** Biol. Reprod., 19:, 1978, 999-1009p.

ESMERALDINO, A.T.; FIALA, S. M.; MALSCHITZKY.; et al. **Imunohistochemical identification of luteinizing hormone receptors in the extra-gonadal reproductive tract of the mare.** Brasil -Animal Reproduction Science, 2010, 1412-1418p .

FAO. **Agricultural Data – FAOSTAT,** 2003. Capturado em 6 abril.. Online. Disponível na internet <http://faostat.fao.org/>. 2011.

FIALA, S. M.; MALSCHITZKY E.; JOBIM M. I.; et al. **Aspectos relacionados ao transporte espermático e resposta inflamatória uterina em éguas.** Revista brasileira de reprodução animal. Belo Horizonte: 2007, v. 31, n.1, p. 3-7.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. C.; MATTOS, A R.; et al. **Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare.** Theriogenology, 2006, 253-255p.

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

FILHO, B. G. **Bogliolo patologia geral.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 9-12p.

GASTAL, M. O., GASTAL, E. L., TORRES, C. A., GINTHER, J. O., **Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares.** Theriogenology, 1998, 989-999p.

GAWRONSKA, B., PAUKKU, T., HUHTAINIEMI, I., WASOVICZ, G., ZIECIK, A.J., 1999. **Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct.** J. Reprod. Fert. 115, 293–301p.

GAWRONSKA, B., STEPIEN, A., ZIECIK, A.J., 2000. **Effect of oestradiol and progesterone on oviductal LHR and LH-dependent relaxation of porcine oviduct.** Theriogenology 2003, 659-667p.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare (basic applied aspects).** 2. ed. Cross plain: Equiservices. 1992, 642p.

GINTHER, O. J. **Selection of the dominant follicle in cattle and horses.** Animal Reproduction Science, Amsterdam: July 2000, v. 60, p. 61-79, Supplement.

GONZALEZ, F. H., CERONI da SILVA, S. Bioquímica hormonal. In: **Introdução à bioquímica hormonal.** 2.ed. Porto Alegre (RS): Editora da UFRGS. 2006. Cap.7, 251-312p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** 7. ed. São Paulo: Manole, 2004, 513p.

KOOISTRA, L. H., GINTHER, O. J.,: **Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares.** Am. J. Vet. Res., 36:, 1975, 1413-1419p.

LEI, ZM; TOTH, O; RAO, ChV; PRIDHAM D. **Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/ human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes.** Journal Clin Endocrinol Metab, 1993, 863-872p.

LEY, B. W. **Reprodução em Éguas.** São Paulo: Roca, 2006, 220p.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo, **Relatório**, CEPEA/ESALQ/USP, Piracicaba: 2006, 250p.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. EUA: WILLIAMS & WILKINS. 1993, 1137p.

McKINNON, A. O. **Hormonal Control of Equine Reproduction**. In: roceedings of the 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners – AAEP. Jan. 25 - 28, 2009 - Gold Coast, Australia. 138-186p.

MELO, D., SADDI, VA., MOMOTUK,EG., **Marcadores moleculares associados ao câncer de mama**. Ver. Bras. Cancerol. 2002; 48: 39-48p.

MINA, CG.; MOREL, D. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. British Library, London, UK, 2008, 145-170p.

OLIVEIRA, V.; MEDEIROS, S. **Hipersecreção do hormônio luteinizante**. Reprod. Clim; 15(4): 194-8, out-dez. 2000, 5-20p.

ÖZGEN, S.; RASCH, K.; KROPP, G.; SCHOON, H.A.; AUPPERLE, H.; SIEME, H.; KLUG, E. **Aetiopathogenesis and Therapy of Equine Hydromucometra: Preliminary**. 1997, v.13, 112-134p.

PAES, JF et al - **Definição histogênica de neoplasias por imuno-histoquímica**. einstein: Educ Contin Saúde. 2008, 6(1 Pt 2): 40-47p.

RICKETTS, S. **Management of the infertiles/subfertile mare**. Proceedings of the 10th international congress of world equine veterinary association. Russia: 2008, 56-62p.

RUIZ, F. S.; ALESSI, A. C.; CHAGAS, C. A. **Imuno-histoquímica na patologia veterinária diagnóstica: uma revisão crítica**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Rio de Janeiro: 2005, 80p.

SEELEY, R. R.; STEPHENS T. D.; TATE P. **Anatomia & Fisiologia**. 6. Ed. Loures: Lusociência, 2003, 230p.

SCHOMBERG, DW. **Growth factors in reproduction**. New York: Springer-Verlag, 1990, 160p.

STEPIEN, A., ZIECIK, A. J., **Second messenger systems in the action of LH and oxytocin on porcine endometrial cells in vitro**. Theriogenology 57: 2217-2227p, 2002.

VALE, W.; BILEZIKJIAN, LM.; RIVER, C. **Reproductive and other roles of inhibins and activins**. In: Knobil E, Neil JD, eds. Reproductive Physuology, Vol 1, 2nd ed. New York: Raven Press, 1994, 203-217p.

VARA, J. A.; **Technical Aspects of Immunohistochemistry**. Vet Pathol 42: p. 405-426. Indiana – USA: 2005.

WEESNER, G.D., NORRIS, T.A., FORREST, D.W., **Biological activity of LH in the peripartum cow: least activity at parturition with an increase throughout the postpartum interval**. Biol. Reprod. 37: 851-858p. 1987.

WERNER, B. et al. **Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica** - J Bras Patol Med Lab, v. 41, n. 5, p. 353-364, outubro 2005

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

