

Biópsias endometriais de éguas: avaliação imuno-histoquímica e definição de protocolo

Endometrial biopsy in mares: immunohistochemical evaluation

Daniela de Carvalho Martins,* Joana Fernandes Eigenheer-Moreira,** Juliana da Silva Leite,*** Ana Maria Reis Ferreira****

Resumo

A imuno-histoquímica é uma importante técnica de diagnóstico e na Medicina Veterinária ainda se faz necessário a realização de testes para padronização dos anticorpos a serem utilizados. O objetivo deste estudo foi avaliar e descrever a imunomarcação de anticorpos anticomponentes celulares e da matriz extracelular humana, como o antivimentina, antidesmina, anti-PCNA, anti-CK20 e antialfa actina de músculo liso, após padronizações na técnica, em amostras de biópsia endometrial de égua. Duas amostras endometriais de vinte éguas foram coletadas. Uma delas foi fixada em formol tamponado a 10% e a outra em Bouin, para processamento e inclusão em parafina e coloração em HE, tricrômico de Gomori, reticulina e imuno-histoquímica com os anticorpos citados anteriormente. Ambos fixadores formol tamponado 10% e Bouin não alteraram a imunomarcação dos anticorpos estudados. Com relação à marcação destes, todos reagiram positivamente após as alterações realizadas no protocolo inicial da técnica, como no bloqueio da peroxidase endógena, recuperação antigênica e inibição das ligações inespecíficas com ajustes de tempo e temperatura. Os anticorpos antivimentina e antidesmina marcaram o endotélio dos vasos sanguíneos; o PCNA, o núcleo das células do epitélio em proliferação; o antialfa actina de músculo liso, o contorno dos ductos glandulares endometriais sugerindo miofibroblastos e o CK-20 evidenciou a queratina no epitélio glândular. A imuno-histoquímica da biópsia endometrial pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico, fornecendo informações necessárias para uma avaliação minuciosa da capacidade reprodutiva do animal, das fases do ciclo estral e anormalidades hormonais e para a detecção de possíveis agentes patológicos que estejam interferindo na vida reprodutiva.

Palavras-chave: equino, endométrio, imunomarcação.

Abstract

Immunohistochemistry is an important diagnostic tool and, in order to use it in the veterinary field, protocol alterations must be made. The aim of this study was to evaluate and describe the cross reactivity of anti-human cell components and extracellular matrix antibodies, like anti-vimentin, anti-desmin, anti-PCNA, anti CK20, anti-smooth muscle alfa actin antibodies, after protocol adjustments in endometrial biopsy samples. Endometrial biopsy samples from twenty Campolina and Mangalarga Marchador mares from Rio de Janeiro state were evaluated. Two samples of each mare were obtained. One was fixed in 10% buffered formalin and the other in Bouin solution. After that, the samples were routinely processed for paraffin embedding and then the sections were Hematoxylin-eosin, reticulin and Gomori trichrome stained. Finally, the sections were immuno-labeled with the previously cited primary antibodies. Both 10% buffered formalin and Bouin solution were adequate for immunohistochemistry when testing the referred primary antibodies. All antibodies showed adequate immunolabelling after protocol adjustments, such as in altering time and temperature of endogenous peroxidase blockage, antigen retrieval and non-specific-binding inhibition. Anti-vimentin and anti-desmin antibodies immunolabeled the blood vessel endothelium. Anti-PCNA antibody detected proliferating cells from the superficial epithelium, glandular and ductal, the estromal and estromal cells by labeling its nucleus. Anti-CK20 antibody showed positive labeling of the endometrial glands keratin. The anti-smooth muscle alfa actin antibody suggested the presence of miofibroblasts surrounding the ducts from the endometrial glands by labeling them. When the immunohistochemistry technique is used in endometrial samples, it may give diagnostic and prognostic assistance by supplying with the necessary information to a better evaluation of reproduction problems.

Keywords: equine, endometrium, immunolabeling.

* Universidade UNIGRANRIO, Duque de Caxias/RJ – e-mail: dany.de@ig.com.br. Rua das Rosas, 814, Vila Valqueire, Rio de Janeiro, RJ, 21330-680. Autor para correspondência.

** Pós-graduação de Clínica e Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense – UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24320-340. E-mail: joana.vet@gmail.com.

*** Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da – UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24320-340. E-mail: jusleite@hotmail.com.

**** Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária UFF. Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24320-340. E-mail: anaferreira@pesquisador.cnpq.br.

Introdução

A biópsia endometrial proporciona informações importantes sobre as condições do endométrio no momento da coleta do fragmento, permitindo a relação entre os achados histopatológicos e o futuro desempenho reprodutivo e a resposta ao tratamento utilizado nesses animais (Queiroz, 1991), sendo assim, muito útil no auxílio ao diagnóstico e prognóstico. Quando usada adequadamente, permite uma avaliação mais minuciosa da capacidade reprodutiva da égua (Kenney e Doig, 1986), assim como de fêmeas de outras espécies (Martins et al., 2002).

A técnica da imuno-histoquímica utiliza conceitos da imunologia aplicados ao estudo histológico, utilizando uma ligação específica do anticorpo com antígenos teciduais (Beesley, 1993) através de substâncias marcadoras acopladas aos anticorpos sem que estes percam a capacidade de se combinar com o antígeno (Junqueira e Carneiro, 1999). Associada à biópsia endometrial, a imuno-histoquímica pode ser utilizada no auxílio de diagnósticos de uma forma mais precisa, na identificação de antígenos que estejam interferindo na vida reprodutiva do animal e também na análise de um endométrio normal (Dellmann e Brown, 1982).

Esta técnica é usada na rotina diagnóstica e na pesquisa em patologia humana desde 1970. Já na veterinária, é relativamente recente, principalmente com objetivo diagnóstico. A maior dificuldade na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Assim, frequentemente se faz uso de anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais como Sun et al. (2000) em ratas, Martins et al. (2004) em cadelas, Ruiz et al. (2005) em cães e Walter et al. (2001), Aupperle et al. (2004), Mansour et al. (2004), Leite et al. (2007) e Roberto da Costa et al. (2007) em éguas.

Uma vez que não se dispõe de anticorpos produzidos especificamente para equinos, o objetivo deste estudo foi avaliar, descrever a imunomarcagem e definir o protocolo imuno-histoquímico para anticorpos anticomponentes celulares e da matriz extracelular humana (antivimentina, antidesmina, anti-PCNA, anti-CK20 e antialfa actina de músculo liso) em amostras de biópsia endometrial de égua.

Material e métodos

Foram realizadas vinte biópsias endometriais (duas amostras por égua) em éguas das raças Campolina e Mangalarga Marchador, de até 10 anos de idade, provenientes do estado do Rio de Janeiro. Foi preenchida uma ficha para cada égua contendo informações necessárias à interpretação da biópsia endometrial, incluindo os achados físicos e a fase do ciclo estral.

O exame físico do trato genital das éguas foi realizado e logo depois foram coletadas as biópsias durante o estro e o diestro, utilizando-se uma pinça de Yoman com 70cm de comprimento, com embocadura ("Boca de Jacaré") de dimensões 20x4x3mm.

Esses fragmentos passaram pelos seguintes tratamentos: dez amostras foram fixadas em formol tamponado e dez em Bouin por um período de 24 a 48 horas, para posterior

comparação. As amostras foram submetidas à técnica de inclusão em parafina de rotina e coradas com Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Gomori, e reticulina para melhor evidenciar as características morfológicas do endométrio biopsiado.

Foram testados cinco anticorpos para imuno-histoquímica em tecidos parafinados (anticorpos primários anticomponentes celulares e da matriz extracelular humana: antialfa actina de músculo liso, anti-CK20, antidesmina, anti-PCNA e antivimentina) e estabelecidas as diluições ideais (Tabela 1).

Tabela 1: Anticorpos utilizados e suas respectivas marcações

ANTICORPOS	MARCAÇÃO
AML	Células de músculo liso de vasos e diferentes parênquimas.
CK20	Queratina de células epiteliais.
DESM	Células musculares lisas e estriadas esquelética e cardíaca.
PCNA	Proliferação celular.
VIM	Células de origem mesenquimal.

AML = antiactina de músculo liso; CK20 = anticitoqueratina 20; DESM = antidesmina; PCNA = *antiproliferating cell nuclear antigen*; VIM = antivimentina.

Para a técnica de imuno-histoquímica foram feitos cortes de 3-4 mm de espessura em lâminas pré-tratadas com silano a 4%. Este material sofreu desparafinização em xilol, seguido da hidratação dos cortes. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com o metanol a 70%.

Somente para o anticorpo CK 20, foram comparados protocolos, com e sem a recuperação antigênica dos cortes (tripsina a 4%). A etapa seguinte, a inibição de ligações inespecíficas foi testada para todos os anticorpos, onde em um dos protocolos os cortes eram incubados com uma solução composta de BSA (soro albumina bovina), TRIS-HCl com cloreto de sódio e leite em pó desnatado (Polak e Van Noorden, 1997), e no outro não. Posteriormente, ocorria a incubação com o anticorpo primário durante 12 horas.

Passado este tempo, todo o material era lavado em tampão TRIS e incubado com anticorpo secundário (complexo estreptavidina-biotina peroxidase). Após lavagem, revelava-se o material com o substrato cromogênico DAB¹ por 3 minutos, mostrando uma reação de coloração marrom. A contracoloração foi feita com Hematoxilina de Mayer. Para o anticorpo primário anti-PCNA foi feita contracoloração com Verde Luz.

Resultados

Ao comparar o formol tamponado a 10%, fixador recomendado para o uso rotineiro da técnica de imuno-histoquímica e o Bouin, fixador de rotina para fixação de biópsias endometriais de éguas, concluiu-se que não houve interferência destes na reação de imuno-histoquímica com os anticorpos primários utilizados, uma vez que todas as amostras fixadas

em formol tamponado a 10% e no Bouin obtiveram reação positiva para todos os anticorpos utilizados.

Uma importante adequação de protocolo realizada que contribuiu com o sucesso da aplicação de todos esses anticorpos primários foi a introdução de uma etapa de inibição de ligações específicas com o uso de uma solução de leite com cloreto de sódio com tempo e temperatura de incubação definidos pelo estudo em um período de 30 minutos em estufa a 37°C. Da mesma forma, no protocolo de imunomarcagem com o anticorpo CK-20, a tripsina foi necessária para a recuperação antigênica, obtendo-se melhores resultados do que quando esta etapa estava ausente. Ou seja, com essas alterações de protocolo, resultados que antes se mostravam negativos ou com ligação inespecífica, apresentaram-se positivos e com melhor especificidade de marcação, o que favoreceu a visualização da marcação.

Com relação à marcação dos anticorpos, todos reagiram positivamente após as adequações descritas acima, realizadas nos protocolos da técnica de imunohistoquímica para uso dos anticorpos antialfa actina de músculo liso, antidesmina, anti-PCNA, anti-CK20 e antivimentina em tecido animal.

O anticorpo antialfa actina de músculo liso (Figura 1A) apresentou uma marcação em marrom ao redor de vasos menos marcante que a do anticorpo anti-desmina (Figura 1B), houve também marcações daquele anticorpo em torno das glândulas, o que nos sugeriu ser devido à presença de miofibroblastos. O anticorpo antivimentina (Figura 1C) também reagiu positivamente imunomarcando o endotélio dos vasos sanguíneos.

Quando utilizou-se o anticorpo anti-PCNA (Figura 1D), houve marcação positiva dos núcleos das células do epitélio superficial, do epitélio glandular e ductal, de células estromais e endoteliais. Apesar de não ter sido o escopo do estudo, ao avaliarmos essa marcação em biópsias realizadas no período do estro e compararmos com as do diestro, pôde-se observar que a marcação das células epiteliais luminais e ductais foi aparentemente maior no estro que no diestro, enquanto a marcação das células epiteliais glandulares foi aparentemente maior no diestro que no estro. O anticorpo anti-CK20 (fig. 1E) também mostrou marcação positiva das células do epitélio superficial e das glândulas, evidenciando a queratina.

Em relação às colorações especiais, estas nos permitiram visualizar a presença de tecido conjuntivo evidenciando o colágeno. Na reticulina, observou-se a presença de fibras reticulares com coloração enegrecida, as quais têm como seu principal

componente o colágeno tipo III, e na coloração de tricrômico de Gomori (Figura 1F) visualizou-se o tecido conjuntivo intersticial em coloração verde.

Discussão

Como em toda técnica, a escolha do fixador mais adequado deve ser feita cuidadosamente. O fixador desnatura as proteínas e estabiliza as células contra a desidratação. A fixação pode reduzir drasticamente o potencial de ligação do antígeno pelo seu anticorpo (Beesley, 1993). Vários pesquisadores utilizam a solução de Bouin para fixação de biópsias endometriais (Ricketts, 1975; Kenney e Doig, 1986; Van Camp, 1988; Mansour et al., 2003; Eigenheer-Moreira et al., 2007). Esta solução fornece uma amostra mais firme do

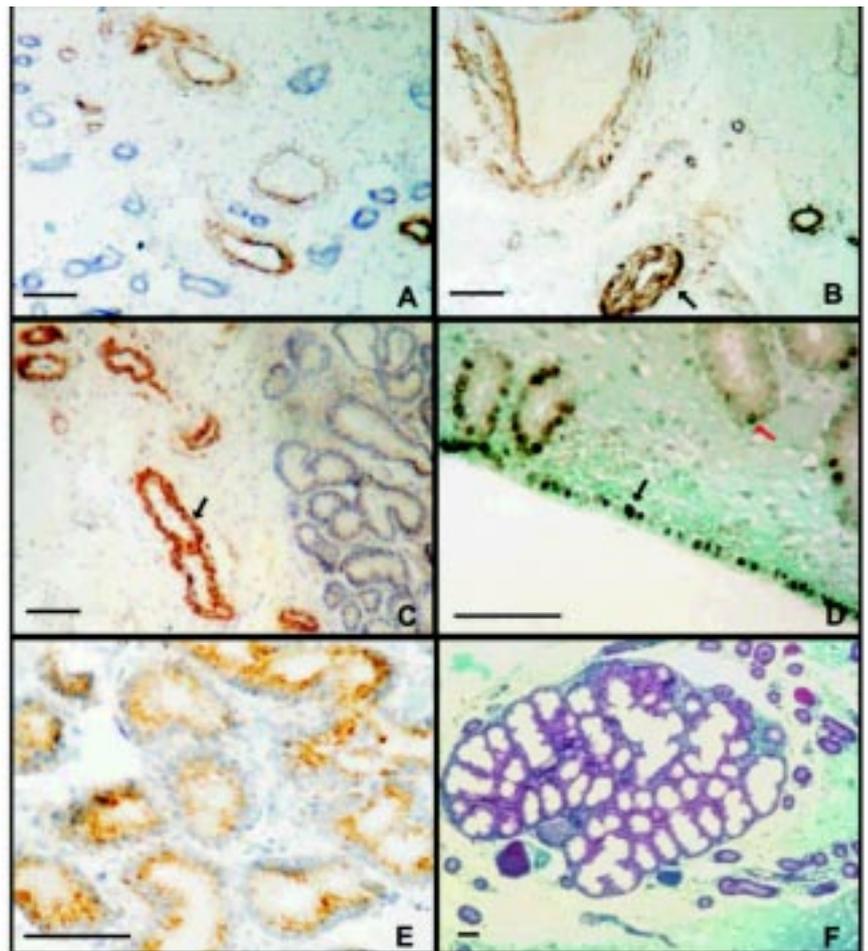


Figura 1: Fotomicrografias do endométrio de éguas das raças Campolina e Mangalarga Marchador. A – Imunomarcagem com anticorpo antialfa actina de músculo liso: observar a coloração acastanhada ao redor dos vasos. B – Corte imunomarcado com anticorpo antidesmina demonstrando o contorno dos vasos e algumas glândulas (seta) marcados em marrom, o que sugere a presença de miofibroblastos. C – Imunomarcagem com anticorpo antivimentina onde pode-se observar reação positiva acastanhada do endotélio vascular (seta). D – Imunomarcagem com anticorpo anti-PCNA pode-se visualizar reação positiva acastanhada nos núcleos das células do epitélio superficial (seta), do epitélio glandular (seta vermelha) e ductal. E – Corte imunomarcado com anticorpo anticitoqueratina 20 que revela marcação positiva acastanhada das células do epitélio superficial e das glândulas, evidenciando a queratina (A-E – Marcação imuno-histoquímica, barra = 100mm). F – Corte corado pelo tricrômico de Gomori: visualiza-se o tecido conjuntivo intersticial com coloração verde (barra = 100 mm).

que o formol, podendo ser usada por 2 a 24 horas (Kenney e Doig, 1986; Van Camp, 1988). O Bouin mantém a arquitetura endometrial, mas ao deixar a amostra por muito tempo, teremos uma preparação histológica de má qualidade (Van Camp, 1988). Assim, optou-se pela comparação entre o formol tamponado a 10%, que é o fixador preconizado pela técnica de imuno-histoquímica (Elias, 1990) e o Bouin, concluindo que não houve alterações nos resultados.

Ruiz et al. (2005) testaram a reatividade cruzada de diversos anticorpos feitos para uso humano em tecido parafinado de algumas espécies animais, utilizando-se dos novos métodos de recuperação antigênica e amplificação da reação imuno-histoquímica. Concluíram que muitos anticorpos, dentre eles o PCNA e a Vimentina, utilizados neste experimento, produzidos para diagnóstico imuno-histoquímico em patologia humana podem ser utilizados em patologia veterinária, resultado este semelhante ao encontrado neste experimento em tecido endometrial de éguas. Da mesma forma, Mansour et al. (2003) descreveram sucesso na marcação de amostras de endométrio de égua pelo anticorpo anticolágeno IV, antilaminina e antifibronectina humana e Leite et al. (2007) do trato gastrintestinal equino pelo anticorpo antimieloperoxidase humana.

Os anticorpos antivimentina, antidesmina e anti-alfa actina são de grande valor na análise de processos de neovascularização, permitindo uma melhor avaliação nos processos de estro, em processos inflamatórios e alterações patológicas (Catalog Immunotech, 1995). Assim como Aupperle et al. (2004) que utilizaram os dois primeiros anticorpos (antivimentina e antidesmina) para determinar o padrão fisiológico do ciclo e as mudanças resultantes da endometriose e Walter et al. (2001) que utilizaram os dois últimos anticorpos (antidesmina e anti-alfa actina) para explorar os mecanismos patológicos que ocorrem na endometriose equina, este estudo obteve resultados positivos com o uso destes anticorpos.

O anticorpo anti-CK20 se mostrou interessante pela observação da marcação da estrutura normal como epitélio, endotélio e presença de queratina, podendo ser importante na identificação de processos patológicos.

A marcação do PCNA nas amostras deste estudo foi satisfatória; está de acordo com a literatura, já que o PCNA é uma proteína cuja síntese ocorre no início da fase G1 e S do ciclo celular e, embora inespecífico, é um excelente marcador para células em proliferação (Dako, 1997; Foschini et al., 2004). Este é muito utilizado na medicina veterinária em pesquisas com diferentes espécies de animais e com

diversos tecidos e também na medicina humana (Sarli et al., 1994; Sun et al., 2000; Zawislak et al., 2001; Martins et al., 2004). O PCNA se torna fundamental pela visualização da capacidade de regeneração do endométrio em processos patológicos e nas fases do ciclo estral.

Assim como observado neste estudo, Roberto da Costa et al. (2007) encontraram maior marcação das células das glândulas no diestro, sugerindo que a hiperplasia celular ocorre no momento em que a histotrofia é necessária para uma eventual nutrição do embrião. Porém, discordaram dos resultados encontrados nesta pesquisa (maior proliferação de células luminais no estro) já que observaram maior marcação das células do epitélio luminal no diestro, sem diferença entre início e meio do diestro.

As colorações especiais utilizadas foram satisfatórias e úteis para identificação de tecido conjuntivo, como o colágeno, como preconizado pela literatura (Junqueira e Carneiro, 1999), nos possibilitando a observação de processos patológicos, como a fibrose, que substitui o tecido funcional normal, podendo acarretar problemas de fertilidade nas éguas.

Apesar deste não ter sido o escopo principal do estudo, pôde-se observar a importância da biópsia endometrial pela riqueza de informação que ela pode trazer a respeito das lesões endometriais, principalmente as subclínicas. Para o diagnóstico delas, a biópsia endometrial têm grande importância para determinar o sucesso do tratamento (Leblanc e Causey, 2009) e é usada como teste ouro em trabalhos científicos (Overbeck et al., 2011)

Conclusão

Os anticorpos utilizados neste estudo (anti-vimentina, anti-desmina, anti-PCNA, anti-CK20 e anti-alfa actina de músculo liso) desenvolvidos inicialmente para diagnóstico imuno-histoquímico em patologia humana podem ser utilizados em patologia veterinária, levando sempre em consideração as variações de clones, diluições, métodos de recuperação antigênica e de revelação. Tanto a solução de Bouin quanto a solução de formol tamponado a 10% podem ser utilizadas como fixador de amostras endometriais que serão submetidas à técnica imuno-histoquímica com o uso destes anticorpos. Portanto, com adequações de protocolo como a introdução de etapas de inibição de ligações inespecíficas, e/ou de recuperação antigênica ou alterações no tempo e temperatura de etapas da reação imuno-histoquímica os anticorpos humanos avaliados podem ser usados em amostras endometriais equinas.

Referências

AUPPERLE, H.; SCHOON, D.; SCHOON, H.A. Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium. *Research in Veterinary*, v. 76, n. 3, p. 249-255, 2004.

BEESLEY, J. *Immunocytochemistry: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1993.

CATALOG IMMUNOTECH. Reagents and kits for immunology, França, 1995.

DAKO. Catalog International. EUA, 1997.

DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. *Histologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

DOIG, P.A.; MCNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Canadian Veterinary Journal*, v. 22, p. 72-76, 1981.

EIGENHEER-MOREIRA, J.F.; FERNANDES, F.T.; QUEIROZ, F.J.R.; PINHO, T.G.; FERREIRA, A.M.R. Estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação histológica do endométrio e das concentrações plasmáticas de progesterona. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, p. 506-512, 2007.

ELIAS, J.M. *Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis*. EUA: The American of Clinical Pathologists, 1990.

FOSCHINI, R.M.S.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v. 67, n. 4, p. 681-687, 2004.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- LEBLANC, M.M.; CAUSEY, RC. Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. v. 44, s3, p. 10-22, 2009.
- LEITE, J.S.; SANTOS, T.M.; FONSECA, E.C.; ALMEIDA, F.Q.; FERREIRA, A.M.R. Imunomarcção do anticorpo antimieloperoxidase no trato gastrointestinal de equinos. *Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 27, p. 84-85, 2007.
- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia: W. B. Saunders Company. v. 2, p. 723-729, 1986.
- MANSOUR, G.D.; HENRY, M.; FERREIRA, A.M.R. Immunohistochemical study of equine endometrial extracellular matrix during oestrus cycle. *Journal of Comparative Pathology*, v. 129, n. 4, p. 316-319, 2003.
- MARTINS, C.F.; VASQUES, L.; NEIS, F.; TARDIN, M.; VISIOLY, V.; FERNANDES, C.E. Biópsia endometrial em vacas *Bos Taurus Indicus* em sistema extensivo com problemas de fertilidade. *Ensaio e Ciência* v. 6, n. 2, p. 13-33, 2002.
- MARTINS, D.C.; FONSECA, E.C.; FERREIRA, A. M. R. Proliferação celular em neoplasias mamárias caninas. *Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 24, p. 97-98, 2004.
- OVERBECK, W.; WITTE, T.S.; HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology in press*, 2011.
- POLAK, J.M. e VAN NOORDEN, S. Introduction to Immunocytochemistry. 2. ed. New York: Springer-Verlag New York Inc, 1997.
- QUEIROZ, F.J.R. Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico da subfertilidade e da infertilidade na égua (*Equus caballus*, L. 1728). 1991. 75 f. Tese (Mestrado) – Centro de Ciências Médicas - Universidade Federal Fluminense, 1991.
- RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 23, p. 341-345, 1975.
- ROBERTO DA COSTA, R.P.; SERRÃO, P.M.; MONTEIRO, S.; PESSA, P.; ROBALO SILVA, J.; FERREIRA-DIAS, G. Caspase-3-mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, n. 8, p. 925-932, 2007.
- RUIZ, F.S.; ALESSI, A.C.; CHAGAS, C.A.; PINTO, G.A., VASSALO, J. Imuno-histoquímica na patologia veterinária diagnóstica: uma revisão crítica. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 41, n. 4, p. 263-270, 2005.
- SARLI, G.; BENAZZI, C.; PREZIOSI, R.; MARCATO, P.S. Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki-67 monoclonal antibodies in canine testicular tumours. *J. Comp. Path.*, v. 110, p. 357-368, 1994.
- SUN, A.; ZHU, P.; WANG, J.; GE Q. Application of mitotic index and proliferating cell nuclear antigen index in monitoring the change of rat endometrium after administration of estrogen and progesterin. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, v. 22, n. 6, p. 573-576, 2000.
- VAN CAMP, S.D.V. Endometrial biopsy of the mare: a review and update. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 4, n. 2, p. 229-249, 1988.
- WALTER, I.; HANDLER, J.; REIFINGER, M.; AURICH, C. Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*. v. 121, p. 581-586, 2001.
- ZAWISLAK, W.; SEMCZUK, A.; MITURSKI, R. Assessment of the PCNA and P53 proteins expression in the proliferative, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekol. Pol.*, v. 72, n. 12A, p. 1549-1554, 2001.